

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
(MONTPELLIER II)

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences (SCIENCES NATURELLES)

HISTOGENESE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ LE RAT.

Etudes chronoarchitectoniques par radioautographie quantitative.

par

Jean - Claude BISCONTE

Soutenue le 20 Janvier 1973 devant la Commission d'Examen.

JURY :	M. R. MARTY, Professeur à l'Université Montpellier II	Président
	M. B. DROZ, Professeur à l'Université Paris VI	} Examineurs
	M. I. ASSENMACHER, Professeur à l'Université Montpellier II	
	M. R. MARIGNAN, Professeur à l'Université Montpellier I	

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
(MONTPELLIER II)

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences (**SCIENCES NATURELLES**)

HISTOGENESE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ LE RAT.

Etudes chronoarchitectoniques par radioautographie quantitative.

par

Jean - Claude BISCONTE

Soutenue le 20 Janvier 1973 devant la Commission d'Examen.

JURY :	M. R. MARTY, Professeur à l'Université Montpellier II	Président
	M. B. DROZ, Professeur à l'Université Paris VI	} Examineurs
	M. I. ASSENMACHER, Professeur à l'Université Montpellier II	
	M. R. MARIGNAN, Professeur à l'Université Montpellier I	

UNIVERSITY OF MONTREAL
FACULTY OF THEOLOGY

THESE

Présentée à l'Université de Montréal
pour l'obtention du grade de

DIPLOME DE LA FACULTÉ DE THÉOLOGIE

En vue de l'obtention du grade de



Présentée par

M. le

M. le

M. le

M. le

Président du jury

LISTE DES PROFESSEURS
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DU LANGUEDOC

PRESIDENT : P. DUMONTET

Vice-Présidents : J. ROUZAUD - G. SAUMADE

Doyens honoraires de la Faculté des Sciences : P. MATHIAS
B. CHARLES
A. CASADEVALL

Professeurs honoraires de la Faculté des Sciences :

R. JACQUES	G. DENIZOT
M. CASTERAS	J. GRANIER
E. CARRIERE	Ch. BOUHET
E. TURRIERE	J. MOTTE
C. CAUQUIL	J. SALVINIEN

Secrétaire Général : E. SIAU

Professeurs titulaires :

M.	M. MOUSSERON	-----	Chimie Organique
M.	J.P. ROIG	-----	Physique
M.	P. CHATELAIN	-----	Minéralogie et cristal- lographie
Mle	O. TUZET	-----	Zoologie
M.	G. COUCHET	-----	Mécanique supérieure
Mle	A.M. VERGNOUX	-----	Physique
M.	J. AVIAS	-----	Géologie
M.	P. VIELES	-----	Chimie
M.	R. MAURY (I.P.A.)	-----	Droit
M.	E. KAHANE	-----	Chimie biologique
M.	J. J. MOREAU	-----	Mécanique rationnelle
M.	B. CHARLES	-----	Mathématiques pures
M.	R. JOUTY	-----	Physique
M.	P. DUMONTET	-----	Physique

M.	R. LEGENDRE	Zoologie
M.	I. ASSENMACHER	Physiologie animale
M.	B. PISTOULET	Physique
M.	Ch. ROUMIEU	Analyse supérieure
M.	J. ROBIN	Physique
M.	A. POTIER	Chimie minérale
M.	R. LAFONT	Physique
M.	R. JACQUIER	Chimie
M.	J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
M.	J. REGNIER	Chimie
Mme	J. CHARLES	Mathématiques
M.	P. CAILLON	Physique
M.	J. ROUZAUD	Chimie
M.	Ch. SAUVAGE	Botanique
M.	H. CHRISTOL (E.N.S.I.)	Chimie
Mme	G. VERNET	Biologie animale
M.	L. CECCHI	Physique
M.	H. ANDRILLAT	Astronomie
M.	M. SAVELLI	Physique
M.	M. MATTAUER	Géologie
M.	L. EUZET	Zoologie
M.	C. DELOUPY	Physique
M.	L. GRAMBAST	Botanique
M.	A. BONNET	Botanique
M.	G. LAMATY	Chimie
M.	R. MARTY	Psychophysiologie
Mme	S. ROBIN	Physique
M.	R. CORRIU (I.U.T.)	Chimie
Mme	N. PARIS	Physiologie végétale
M.	J. ZARZYCKI	Sciences des matériaux (Physique du Solide)
M.	S. GROMB	Chimie physique
M.	F. SCHUE	Chimie organique



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548320_0016

Professeurs sans chaire :

M.	G. TOURNE	-----	Chimie
M.	J. REMY	-----	Géologie
M.	P. DEMANGEON	-----	Géologie
M.	E. GROUBERT	-----	Physique
Mme	H. GUASTALLA	-----	Biologie physico- chimique
M.	R. LENEL	-----	Biologie animale
M.	F. PROUST	-----	Géologie
M.	A. BASSOMPIERRE	-----	Physique
M.	M. MAURIN	-----	Chimie
M.	N. ROBY	-----	Mathématiques
M.	R. GAUFRES	-----	Chimie
M.	J. PARIS	-----	Zoologie
M.	G. BOUGNOT	-----	Physique
M.	M. ROUZEYRE	-----	Physique
M.	P. SABATIER	-----	Mathématiques
M.	P. MOLINO	-----	Mathématiques
M.	L. THALER	-----	Géologie
M.	J. LEGRAND	-----	Physiologie animale
M.	R. JONARD	-----	Botanique
M.	R. CANO (I.U.T.)	-----	Mesures physiques
M.	J. P. FILLARD (I.U.T. Nîmes)	-----	Génie électrique
M.	J.M. MORETTI	-----	Biochimie
M.	J.L. IMBACH	-----	Chimie

Professeurs associés :

M.	E. AKUTOWICZ	-----	Mathématiques
M.	A. MICALI	-----	Mathématiques
M.	C. VAGO	-----	Biologie animale
M.	L. DAUZIER	-----	Physiologie animale
M.	H. HELSON	-----	Mathématiques

Maîtres de Conférences :

M.	G. LOUPIAS	-----	Mathématiques
M.	Ch. CASTAING	-----	Mathématiques

M.	J.D. BAYLE	Physiologie animale
M.	R. HAKIM	Mathématiques
Mme	M. HAKIM	Mathématiques
M.	F. HALLE	Biologie végétale
M.	G. MASCHERPA	Chimie
M.	F. LAPSCHER	Mathématiques
M.	J. GARCIA (I.U.T.)	Génie mécanique
M.	M. DENIZOT	Biologie végétale
M.	B. BRUN	Chimie physique
M.	L. GIRAL	Chimie organique
M.	P. JOUANNA (I.U.T.)	Génie civil
M.	L. LASSABATERE (I.U.T.)	Mesures physiques
M.	C. GOUT	Physique
M.	J.P. TRILLES (I.U.T.)	Biologie appliquée
M.	G. LECOY (I.U.T.)	Génie électrique
M.	G. BORDURE (I.U.T.)	Génie électrique
M.	Y. PIETRASANTA (E.N.S.I.)	Chimie appliquée
M.	M. AMANIEU (Sciences & Techniques)	Hydrologie et mari- culture
M.	J. CROUZET (Sciences & Techniques)	Biochimie appliquée
M.	A. COMMEYRAS	Chimie organique
M.	H. MATHIEU (Sciences & Techniques)	E.E.A. Electronique mesures
M.	J.L. ROBERT (I.U.T. Nîmes)	Génie électrique
M.	P. LOUIS	Géophysique appliquée
M.	Ch. DURANTE (Sciences & Techniques)	Automatique
Mle	M. LEVY (I.U.T.)	Chimie
M.	J. LAGARRIGUE (I.U.T.)	Biologie appliquée
M.	Cl. DROGUE (Sciences & Techniques)	Hydrogéologie
M.	P. GENESTE (E.N.S.I.)	Chimie physique appliquée
M.	J. CHEFTEL (Sciences & Techniques)	Biochimie appliquée à l'alimentation
M.	M. AVEROUS (I.U.T. Nîmes)	Génie électrique
M.	B. LEMAIRE (Sciences & Techniques)	Mathématiques appli- quées Informatique
M.	M. VALADIER	Mathématiques
M.	O. MAISONNEUVE (I.U.T.)	Informatique

Maîtres de conférences associés :

M. Y. CORMARY ----- Géologie
M. C. MAURIN ----- Biologie animale

Chargé d'enseignement :

M. M. LEFRANC ----- Mathématiques
M. Y. ESCOUFFIER (I.U.T.) ----- Informatique
M. B. FILLIATRE, ----- Informatique
M. Y. CESARI (I.U.T.) ----- Informatique
M. P. BESANCON ----- Physiologie de la
nutrition appliquée
à l'alimentation.

Chargé de cours :

M. G. SAUMADE (I.U.T.)
M. J. GUIN (I.P.A.)
M. Cl. PEROCHON (I.U.T.)

HISTOGENESE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ LE RAT.
Etudes chronoarchitectoniques par radioautographie quantitative.

par

Jean-Claude BISCONTE

Laboratoire de Neurophysiologie

Université des Sciences et Techniques
du Languedoc - 34060 MONTPELLIER

Ce travail a bénéficié de subventions ou de l'aide technique de la part
des organismes suivants :

- Centre National de la Recherche Scientifique (E.R.A. n° 187).
- Délégation Générale pour la Recherche Scientifique et Technique (Contrats n° 67.00.896 et 69.01.974).
- Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.
- Fondation pour la Recherche Médicale Française.
- Département de Biologie du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.
- Laboratoire d'Etudes et de Techniques de l'Informatique du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble.

A tous les miens,

A mes Maîtres,

AVANT - PROPOS

Au Professeur R. MARTY, j'exprime ma très profonde gratitude. Il m'a accordé sa confiance et n'a jamais ménagé ses efforts pour me donner les moyens techniques et financiers que requerrait ce travail. Sa passion pour la recherche et l'extraordinaire richesse de sa personnalité demeureront des exemples dont je m'efforcerai de rester digne.

Monsieur le Professeur B. DROZ m'a fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse pour laquelle, dès le début, j'ai pu bénéficier de sa très haute compétence, particulièrement en matière de radioautographie. Qu'il me soit permis de lui exprimer mon attachement et mon admiration.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur I. ASSENMACHER d'avoir bien voulu s'intéresser à ce travail et d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Qu'il me permette de lui témoigner ici ma respectueuse gratitude.

Je voudrais assurer Monsieur le Professeur R. MARIGNAN de ma très vive reconnaissance pour sa constante bienveillance à mon égard et pour l'accueil chaleureux que j'ai toujours trouvé dans son Laboratoire.

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Neurophysiologie et je voudrais remercier ici tous ceux qui, à des titres divers, m'ont aidé au cours de sa réalisation.

Je veux cependant remercier tout particulièrement Madame Mireille CHAT, Biologiste du C.N.R.S., pour la collaboration très efficace qu'elle m'a apportée pour l'illustration de cette thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur Pierre MASSAL, mathématicien, qui a participé directement à l'élaboration du chapitre mathématiques de ce travail.

Ma reconnaissance va également à Monsieur Charles FAVIER, ingénieur, ainsi qu'à l'équipe du L.E.T.I. de Grenoble, pour leur importante contribution à la réalisation des équipements électroniques.

Enfin, je suis très heureux de remercier bien sincèrement, pour leur compétence et leur dévouement, Monsieur Pierre SIBLEYRAS, photographe, et Madame Jacqueline BOYER, qui s'est chargée de la mise au net du manuscrit.

S O M M A I R E

(Première Partie)

INTRODUCTION	p	1
MATERIEL ET METHODES		
I - ANIMAUX		
A/ Provenance des rats utilisés	p	4
B/ Datation des femelles gestantes	p	4
C/ Répartition générale des lots expérimentaux	p	5
II - MOLECULES		
A/ Conditions de stockage	p	5
B/ Temps de disponibilité et métabolisme	p	6
C/ Radiotoxicité des molécules	p	7
D/ Doses et modalités d'injection	p	7
III - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES		
A/ Fixation	p	10
B/ Coupes histologiques	p	10
C/ Colorations	p	11
IV - TECHNIQUES RADIOAUTOGRAPHIQUES		
A/ Méthodes qualitatives et quantitatives	p	11
B/ Préparation radioautographique	p	12
C/ Analyse radioautographique	p	14
RESULTATS ET DISCUSSION		
I - METHODE DE RADIOAUTOGRAPHIE QUANTITATIVE		
RESULTATS		
A/ Molécules	p	17
B/ Centrifugation des lames	p	20
C/ Analyse radioautographique	p	21

DISCUSSION

A/ Molécules	p	40
B/ Centrifugation des lames	p	40
C/ Analyse radioautographique	p	41

II - CARACTERISTIQUES STRUCTURALES ET RADIOAUTOGRAPHIQUES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	p	47
---	---	----

RESULTATS

A/ Cycle évolutif des zones ventriculaires	p	50
B/ Paramètres du marquage radioautographique prénatal	p	56
C/ Cycles génératifs	p	56
D/ Autres zones prolifératives	p	57

DISCUSSION

A/ Cycle évolutif des zones ventriculaires	p	59
B/ Marquage ventriculaire initial	p	61
C/ Cycle génératif	p	62
D/ Autres zones prolifératives	p	64
E/ Conclusions	p	64

III - PARAMETRES DU MARQUAGE RADIOAUTOGRAPHIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ADULTE	p	65
---	---	----

RESULTATS

A/ Région composée de neurones de la même génération (histo- grammes partiels)	p	71
B/ Répartition du marquage dans une région composée de neu- rones de générations successives (histogrammes globaux) ...	p	75
C/ Influence de p,TC et TS sur P% et MG	p	78
D/ Variations de P% et MG liées aux caractéristiques de stratification cellulaire	p	80

DISCUSSION

A/ Régions neuroniques composées d'une seule génération cellu- laire (histogramme partiel)	p	86
B/ Régions neuroniques composées de plusieurs générations cellulaires (histogrammes globaux)	p	87
C/ Détermination de la date d'origine des neurones	p	89
D/ Détermination des caractéristiques de stratification (Le concept de chronoarchitectonie)	p	91

IV - ANALYSE CHRONOARCHITECTONIQUE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ADULTE .. p 93

RESULTATS

A/ Télencéphale

1. Isocortex p 96
2. Allocortex p 109
3. Striatum p 115
4. Complexe septal p 119

B/ Diencéphale

1. Hypothalamus p 122
2. Epithalamus, subthalamus et thalamus p 124

C/ Mésencéphale et rhombencéphale

1. Tectum p 128
2. Substance grise centrale p 129
3. Noyaux de la calotte et du plancher p 130
4. Noyaux du pont, noyaux de la calotte pontique, noyaux
du corps trapézoïde et du lemniscus latéral p 131
5. Noyaux bulbaires et cérébelleux p 131

DISCUSSION

- A/ Télencéphale p 133
- B/ Diencéphale p 147
- C/ Mésencéphale p 153
- D/ Rhombencéphale p 155
- E/ Conclusions p 156

V - LOIS GENERALES DE L'ORGANISATION CHRONOARCHITECTONIQUE p 158

RESULTATS

- A/ Macroneurones p 159
1. Gradient caudo-rostral p 159
 2. Ensemble des gradients, lois d'organisation p 166
- B/ Microneurones et cellules gliales p 170
1. Caractéristiques spatio- temporelles p 172
 2. Classification des régions contenant des microneurones .. p 173
 3. Relations avec les lois chronoarchitectoniques p 174

4. Relations entre microneurones et cellules gliales	p	174
5. Hypothèse phylogénétique	p	175
C/ Schéma général de l'histogenèse dans le système nerveux central	p	176
1. Caractéristiques cellulaires : aspects morphologiques et cinétiques ...	p	176
2. Schéma de l'histogenèse dans le système nerveux central	p	178
3. Chronologie et différenciation cellulaire	p	178
DISCUSSION		
A/ Morphogenèse du système nerveux central	p	182
B/ Cinétique de la migration cellulaire	p	184
C/ Mécanismes régulateurs de la migration et du positionnement cellulaire	p	186
D/ Différenciation cellulaire	p	187
CONCLUSIONS GENERALES	p	190
RESUME	p	194
BIBLIOGRAPHIE (cf. deuxième partie).		

I N T R O D U C T I O N

L'ontogenèse et l'histogenèse du système nerveux central font depuis une décennie l'objet d'un réexamen systématique. Ce regain d'intérêt est principalement lié à l'apparition de la technique radioautographique, appliquée à la détection du marquage cellulaire de l'ADN par la thymidine tritiée. Pour la plupart d'entre eux, les résultats obtenus sont d'un ordre différent de ceux que les méthodes classiques permettent d'acquérir. En effet, ils révèlent les paramètres de la cinétique cellulaire en apportant une dimension nouvelle en histologie : la dimension temps (LEBLOND, 1965). Dans le système nerveux central, on peut grouper les résultats cinétiques en 4 catégories : prolifération cellulaire, cycle génératif, voies de migration et date d'origine des neurones. Dans cette dernière, la procédure consiste à repérer sur des coupes histologiques de cerveau adulte les neurones marqués contemporains de l'injection prénatale de thymidine tritiée. L'étude de plusieurs animaux, marqués chacun à des stades différents, permet en principe de reconstituer la chronologie de mise en place des neurones constitutifs d'une région. La première étude de cet ordre, réalisée sur le cortex cérébral de Souris (ANGEVINE et SIDMAN, 1961), montra que, contrairement à l'hypothèse classique de TILNEY (1933), les neurones se plaçaient d'autant plus près de la surface corticale qu'ils étaient plus récents. Mais, comme il en fut pour les travaux qui suivirent, ces résultats n'étaient qu'approximatifs, les auteurs se heurtant à des difficultés considérables pour passer à une étape quantitative plus pré-

cise. En effet, le nombre de neurones marqués dans une seule coupe pouvant atteindre plusieurs milliers et la détection se faisant en général sous objectif à immersion, la reconstitution de cartes représentatives de leur répartition est extrêmement longue ; d'autre part, ces cellules présentent tous les degrés de marquage. Aussi est-il difficile de savoir à partir de quel niveau de marquage on doit considérer un neurone comme contemporain de l'injection.

En 1965 et à la suite des travaux de MARTY (1962) sur la hiérarchie chronologique réciproque des systèmes primaires et associatifs, nous entreprîmes d'étudier l'ontogenèse du thalamus. Les expériences préliminaires révélèrent immédiatement que, dans une structure aussi complexe, la radioautographie ne pourrait apporter de résultats significatifs qu'une fois résolus les problèmes fondamentaux énumérés précédemment. Les étapes successives que nous avons suivies pour y parvenir sont au nombre de trois : * Mise au point d'une technique radioautographique rapide et adaptée à l'analyse quantitative (BISCONTE, 1967 ; BISCONTE et al., 1968) ; * étude systématique des paramètres susceptibles de modifier les caractéristiques du marquage radioautographique (molécules marquées et paramètres prénataux, BISCONTE et MARTY, 1967) ; * définition des règles qui commandent l'évolution des patterns de marquage dans le système nerveux central.

En 1968, un modèle précis de l'ontogenèse thalamique comportant près de 30 cartes détaillées, obtenues par cartographies semi-automatiques, était réalisé (BISCONTE et MARTY, 1968). Il devait être confirmé en 1970 par une étude d'ANGEVINE sur le thalamus de Souris, succédant à un travail très détaillé sur l'histogenèse de la région hippocampique chez le même animal (ANGEVINE, 1965). Cependant, même à l'heure actuelle, le nombre de travaux portant sur l'histogenèse prénatale reste extrêmement réduit et aucun de ceux qui ont été publiés n'a abordé le problème dans son ensemble (Souris : colliculus supérieur, DELONG et SIDMAN, 1962 ; Souris : noyaux gris du pont et

réticulaires, TABER PIERCE, 1966 ; Rat : isocortex, vitesse de migration, HICKS et D'AMATO, 1968 ; Souris : bulbe olfactif, HINDS, 1968 ; Lapin : noyaux thalamiques antérieurs, FERNANDEZ, 1969 ; Rat : hypothalamus, IFFT, 1972). La raison de cette restriction tient évidemment aux causes précitées, bien résumées par cette phrase d'ANGEVINE (1970, p. 142) : "Le projet initial consistait à établir un calendrier intéressant tout le diencephale... Les problèmes posés par l'obtention de séries comparables de coupes répondant aux besoins autoradiographiques et la difficulté de cartographier la position des cellules dans une aire relativement vaste du cerveau empêchèrent d'atteindre cet objectif".

Du fait que notre technique permettait un traitement rapide et précis des informations radioautographiques et éliminait tous les problèmes posés par la cartographie, il fut décidé d'étendre nos investigations à l'ensemble des régions encéphaliques afin d'en dresser *l'inventaire chronoarchitectonique* dans une perspective phylogénétique.

Enfin, pour valider la méthode cartographique, une expérimentation complémentaire fut réalisée en utilisant une molécule marquée différente, la thymidine ^{14}C qui, à notre connaissance, n'avait jamais été utilisée dans de telles études. Les atlas radioautographiques ainsi établis chez des animaux jeunes et adultes ont été rassemblés avec l'atlas cartographique composé à partir des études effectuées avec la thymidine tritiée et l'atlas synthétique des résultats chronoarchitectoniques. Cet ensemble, qui constitue la 2^e Partie de notre étude, est présenté indépendamment, afin de faciliter le report aux illustrations au cours de la lecture.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I - ANIMAUX

A - Provenance des rats utilisés :

1/ Centre d'élevage de la Faculté de Pharmacie de Montpellier :

Rats souche U.A.R. Wistar. Utilisation de rats mâles pour le métabolisme de la thymidine et de femelles pour les expériences de prolifération et de détermination des cycles génératifs.

2/ Centre de recherche et d'élevage des Oncins : Rats O - FA, autrefois nommés C.F.E. (Carworth Farmus Ellias) et de souche Sprague-Dawley. Les femelles ont été utilisées dans les expériences portant sur le cycle génératif, la migration cellulaire et la date d'origine des neurones.

B - Datation des femelles gestantes :

Les rattes primipares O-FA ont une durée de gestation comprise entre 21 et 22 jours. Au centre d'élevage, les femelles sont mises en présence d'un mâle entre 17 h et 8 h du matin. La datation se fait selon la méthode de WITSCHI (1956), c'est-à-dire que le temps de gestation est celui de l'accouplement supposé moins 8 heures, cette durée de 8 heures correspondant à l'intervalle probable entre l'accouplement et la première division de l'oeuf. Pour réduire au maximum l'inévitable incertitude concernant cette datation, seules ont été retenues les rattes dont la date de parturition correspondait

aux prévisions établies à partir des critères définis ci-dessus.

C - Répartition générale des lots expérimentaux :

Les quantités d'animaux utilisés sont représentées dans le tableau 1 en fonction de l'utilisation expérimentale.

Nature de l'expérience	Rattes gestantes	Embryons	Nouveaux-nés	Adultes
A. Mise au point de la technique de perfusion multiple.				13
B. Métabolisme de la thymidine.				210
C. Mises au point histologiques (colorations, congélation, atlas).			17	25
<u>Expériences avec Marquage</u>				
A. Essais de dilution et de doses	8	27		
B. Prolifération et cycles génératifs	6	76		
C. Migration				
- avec laparotomie de contrôle	21		10	21
- sans laparotomie	62		19	62

Tableau 1.- Répartition des lots expérimentaux.

II - MOLECULES

A - Conditions de stockage :

Nous avons utilisé 3 formes de thymidine (C.E.N. de Saclay) :

- 1) thymidine méthyle ^3H (activité spécifique = 9,7 Ci/mM)
- 2) thymidine méthyle ^{14}C (activité spécifique = 12 Ci/mM)
- 3) thymidine 2 - ^{14}C (activité spécifique = 48 mCi/mM)

Pour réduire l'importance des phénomènes d'autodécomposition qui se produisent avec les molécules tritiées quelle que soit leur activité spécifique (15 % par mois à $+ 2^\circ\text{C}$ pour des molécules comparables aux nôtres, EVANS, 1966), le stockage à basse température (-196°C , APELGOT et al., 1966) a été employé lorsque les molécules ne pouvaient être utilisées dans la semaine suivant la livraison. Il n'a de toute façon jamais dépassé un mois. Pour les molécules marquées au ^{14}C , les phénomènes de radiolyse étant faibles (quelques % par an à la température ordinaire, CLEAVER, 1967), il n'a pas été pris de précautions particulières, si ce n'est celle d'utiliser le produit moins de 6 mois après sa livraison.

B - Temps de disponibilité et métabolisme :

En l'absence d'information concernant le temps de disponibilité et le métabolisme de la thymidine en fonction du mode et des doses d'injection chez le Rat, une expérimentation a été entreprise préliminairement à l'emploi de cette molécule (BISCONTE, 1967 ; FULCRAND, BISCONTE et MARTY, 1968) : chez 210 Rats les trois formes de thymidine ont été employées à des doses variables en fonction du mode d'injection : 20 μCi pour 150 g de poids en injection intramusculaire et intrapéritonéale, 10 μCi pour 150 g de poids en injection intraveineuse. Les prélèvements sanguins ont été effectués par voie intracardiaque à des temps échelonnés sur un même animal (10 rats au total) ou, le plus souvent par décapitation sur des rats différents (200 rats), ceci pour éliminer l'influence d'effets secondaires consécutifs aux prélèvements. Quant aux urines, elles ont été recueillies après cathétérisme de la vessie.

L'identification des métabolites a été faite par chromatographie sur plaque, électrophorèse et lyophilisation (eau tritiée) à partir des urines et du plasma. Les comptages de radioactivité portant sur le sang total, plasma et culot, urines, eau tritiée ont été conduits en scintillation liquide ou en phase gazeuse pour le ^{14}C .

C - Radiotoxicité des molécules :

Les doses injectées ont été choisies en fonction des effets de radiotoxicité à court et à long terme, induits par la thymidine tritiée. On sait en effet qu'à certaines doses, des lésions chromosomiques avec mort cellulaire peuvent subvenir aussi bien avec la thymidine ^3H qu'avec la thymidine ^{14}C (PAINTER et DREW, 1958 ; JOHNSON et CRONKITE, 1959 ; WIMBER, 1959 ; LISCO et NISHIMURA, 1961 ; WIMBER, 1964 ; POTTER, 1971). Néanmoins, on admet généralement lors d'expérimentations sur animaux entiers, qu'aucun de ces effets n'est décelable pour des doses inférieures à 2 μCi par gramme de poids corporel (CLEAVER, 1967).

D - Doses et modalités d'injection :

1/ Prolifération et cycle génératif (stades prénataux)

+ Molécules utilisées : thymidine ^3H selon deux modalités d'injection.

a/ Marquage flash chez la mère

Après une injection intrapéritonéale de 500 à 600 μCi (2 $\mu\text{Ci/g}$ corporel) la laparotomie est pratiquée à des moments variés suivant les animaux (de 1 à 12 heures).

b/ Marquage flash chez le fœtus

Après laparotomie de la ratte gestante, les fœtus reçoivent l'injection par voie intraplacentaire ou intra amniotique, à raison de 10 μCi

pour chacun. Les prélèvements des foetus appartenant à une même ratte sont échelonnés jusqu'à un maximum de 6 heures après l'injection.

2/ Migration et date d'origine des neurones (stades postnataux)

+ Molécules utilisées : thymidine ^3H ou ^{14}C (tableau 2).

Laparotomie de contrôle sur certaines femelles avec mesures et photographies des cornes utérines.

* Thymidine tritiée :

a/ Marquage flash

1 injection de 500 à 600 μCi (2 $\mu\text{Ci/g}$ corporel).

b/ Marquage prolongé (1 h)

3 injections identiques toutes les 20 minutes (au total, 2 $\mu\text{Ci/g}$ corporel).

c/ Marquage prolongé (2 h)

5 injections toutes les 25 minutes (au total, 2 $\mu\text{Ci/g}$ corporel).

* Thymidine ^{14}C :

a/ Marquage flash

1 injection de 150 μCi environ (0,5 $\mu\text{Ci/g}$ corporel).

b/ Marquage prolongé (1 h)

3 injections toutes les 20 minutes (au total, 0,5 $\mu\text{Ci/g}$ corporel).

c/ Marquage prolongé (7 h)

7 injections toutes les heures (au total, 1 $\mu\text{Ci/g}$ corporel).

Jours de gestation	Thymidine ³ H			Thymidine ¹⁴ C		
	Modalités d'injection			Modalités d'injection		
	Flash	1 heure	2 heures	Flash	1 heure	7 heures
8,5	x					
9						
9,5	x	x				
10						
10,5		x		x	x	xx
11	x		xx			xx
11,5	x	x	xxx	x	x	xx
12			xx			x
12,5	x	x	xx	x	x	x
13			x			x
13,5	x	x	xx	x	x	
14			x			
14,5	x	x	xx	x	x	
15			xx			
15,5	x	x	xx	x	x	
16			x	x		
16,5	x	x	xx	x	x	
17						
17,5		x	xx		x	
18						
18,5		xx		x		
19						
19,5		xx	x		x	
20						
20,5		x	x		x	
21						
21,5		x	xxx		x	

Tableau 2 .- Répartition des lots expérimentaux dans les expériences de détermination de la date d'origine des neurones (chaque ratte gestante est représentée par une croix).

III - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

A - Fixation :

1/ Adultes : initialement, le rinçage au sérum physiologique et la perfusion de formol neutre salé se faisaient au bock. Par la suite, une technique mettant en oeuvre une pompe péristaltique à 6 canaux a été utilisée, le contrôle de la pression de perfusion des 6 animaux étant assuré par un manomètre à liquide.

2/ Jeunes animaux : lorsque la taille des animaux ne permettait pas d'utiliser cette technique, le cerveau était fixé, après dissection, par immersion dans le liquide de Carnoy ou encore le formol neutre salé classique, mais employé frais (6°C).

3/ Embryons et fœtus : Procédure identique.

- *Remarque* : Quelques cerveaux ont été fixés par l'azote liquide et coupés à congélation, une postfixation à l'alcool ou à la vapeur de formol précédant les opérations de coloration. Certains ont été lyophilisés, puis inclus dans la paraffine sans avoir été fixés. Enfin, quelques animaux ont été fixés avec un des mélanges fixateurs de Cajal en vue d'imprégnation métallique.

B - Coupes histologiques

1/ Prolifération et cycle cellulaire :

La plupart des embryons ont été coupés à 8 μm au cryostat, après enrobage dans la gélatine et congélation.

2/ Migration et date d'origine des neurones :

Après inclusion sous vide dans la paraffine, coupe à 6 μm le plus souvent.

C - Colorations

Dans la plupart des cas, les colorations ont été effectuées chronologiquement après les opérations radioautographiques. Différentes méthodes ont été employées (THURSTON et JOFTES, 1963).

1/ Cinétique cellulaire en général :

- Coloration de Nissl au violet de crésyl, selon la variante de FERNSTROM (1958).

2/ Atlas :

- Coloration de Nissl au violet de crésyl, selon la même variante.

- Coloration au Soudan noir B

- Coloration de KLÜVER et BARRERA (1953)

- Coloration à l'hématoxyline selon Heidenhain-Woelcke.

- Imprégnations argentiques selon Cajal.

IV - TECHNIQUES RADIOAUTOGRAPHIQUES

A - Méthodes qualitatives et quantitatives :

Par leur principe, les méthodes radioautographiques se prêtent autant à l'analyse quantitative qu'à l'analyse qualitative (BASERGA et NEMEROFF, 1963 ; ROGERS, 1967a,b; FISCHER et WERNER, 1971 ; GAHAN, 1972). Mais, pratiquement, la plupart des travaux de radioautographie sont de type qualitatif, probablement en raison d'un certain nombre de difficultés méthodologiques qui limitent leur intérêt quantitatif : 1° - au niveau de la préparation radioautographique les problèmes concernent essentiellement l'homogénéité du précurseur (DIAB et ROTH, 1970), du tissu et des émulsions (CHERNIK et EVANS, 1968 ; ENGLAND et ROGERS, 1970 ; CAVINESS et BARKLEY, 1971) ; 2° - lors de l'analyse, l'observateur rencontrera surtout des difficultés de détection (objectivité et limites de mesure du

capteur) et de situation spatiale de l'information détectée ; 3°- lors du traitement des données histologiques et radioautographiques, les problèmes seront ceux de la représentation graphique et du traitement numérique.

Bien qu'il existe différentes solutions à ces problèmes, toutes ont en commun une lenteur et une difficulté d'emploi qui restreignent leur domaine d'application à celui de l'échantillonnage (FITZGERALD et al., 1965). Compte tenu de l'objet de nos recherches, nous nous sommes attachés à développer une méthodologie d'ensemble visant tout particulièrement à la rapidité opérationnelle en réponse à la grande quantité des informations à traiter (coupes sériées sur tissu hautement différencié).

B - Préparation radioautographique :

1/ Mise en place des émulsions :

Aux deux méthodes précitées correspondent en général des émulsions et des techniques d'applications différentes. Les émulsions pelliculables (stripping-film, PELC, 1952, 1956) ou sur plaques (BISCONTE et al., 1969) conviennent pour le travail quantitatif, alors que les émulsions liquides (BELANGER et LEBLOND, 1946 ; BELANGER, 1952 ; JOFTES, 1959 ; KOPRIWA et LEBLOND, 1962 ; KOPRIWA, 1966) sont destinées par principe aux travaux non quantitatifs.

Contraints par les impératifs de notre sujet à l'emploi d'une technique à la fois rapide et quantitative, le stripping-film, d'application délicate et se prêtant mal à la photométrie quantitative par réflexion (FISCHER, 1971) fut écarté.

La technique que nous avons mise au point repose sur l'utilisation des émulsions liquides par l'intermédiaire d'un procédé qui assure un étalement régulier et constant de la couche sensible. Néanmoins, utilisé en parallèle, le stripping-film sur émulsion Kodak AR 10 a permis des étalonnages et des comparaisons. Dans certains cas, en particulier lorsque le nombre des lames était

faible, nous avons conservé la méthode classique de coulage par pesantier (DROZ et WARSHAWSKY, 1963 ; DROZ, 1966) en la modifiant légèrement (BISCONTE, 1967). Le faible rendement des émulsions liquides employées pour le tritium (Ilford K2 et L4) lorsqu'on les applique au ^{14}C nous a incité dans ce cas à utiliser l'émulsion Ilford G5 sur plaque et le Kodirex avec de meilleurs résultats.

Procédé de coulage de l'émulsion par centrifugation :

L'idée de base était de centrifuger les lames porteuses des coupes histologiques après les avoir trempées dans l'émulsion liquide. Pour vérifier la validité du procédé notamment sur le plan de l'homogénéité, une analyse d'épaisseur de l'émulsion recouvrant des lames témoins a été faite photométriquement dans des conditions variées d'ambiance et de centrifugation (cf. Résultats techniques). Les émulsions liquides (K2, L4) sont traitées dans l'obscurité totale, dans une pièce équipée d'un sas et climatisée (28°C et 60 % d'humidité relative), suivant la méthode classique : dilution 1 : 1, chauffage au bain-marie à 42°C, homogénéisation et élimination éventuelle des bulles par filtration sur gaze humide (DROZ, 1966). Après coupe à la congélation ou à la paraffine (suivie d'un déparaffinage dans ce cas), les lames histologiques sont groupées par 4 dans des griffes plastiques selon un procédé inspiré de COLEMAN (1965) et TRAURIG (1967). Les lames ainsi groupées sont plongées 10 secondes dans l'émulsion, puis centrifugées 1 minute à 2000 tours (centrifugeuse Jouan E 61) par ensemble de 16 lames (4 griffes). Après séchage complémentaire de 2 minutes à 40°C, les lames sont placées dans des récipients remplis éventuellement d'azote avant fermeture étanche. Ce procédé de base a ultérieurement donné lieu à un ensemble de perfectionnements qui permettent le traitement simultané d'un grand nombre de lames à tous les stades de la préparation radioautographique.

2/ Pose radioautographique :

D'une durée moyenne d'un mois à la température de 6°C, elle s'est effectuée sous atmosphère d'azote dans les cas nécessitant une exposition supé-

rière à 2 mois (FLINN, 1964). Ces conditions d'ambiance ont été choisies afin de réduire l'importance des phénomènes de fading et de background (TONNA et CRONKITE, 1958 ; SAWICKI et PAWINSKA, 1965 ; SAWICKI et al., 1968).

3/ Révélation, fixation, rinçage :

Toutes ces opérations se déroulent également en obscurité totale, les lames demeurant groupées. La température des bains est de 20°C. La révélation se fait pendant 3 minutes dans le D 19 dilué 1 : 1 ; elle est suivie d'un bain arrêt acétique (1 minute), d'une fixation à l'hyposulfite (6 minutes) et d'un rinçage soigneux à l'eau distillée fraîche (10 C), ne dépassant pas 30 minutes pour éviter la contamination bactérienne de la gélatine et la perte partielle de marquage (ROWINSKI et al., 1971). Lorsqu'il s'agit de plaques G 5 ou AR 10, ces temps sont augmentés de 50 %.

C - Analyse radioautographique :

1/ Détection du marquage radioautographique :

On considère qu'en la matière l'oeil humain n'est apte à effectuer des mesures précises que si le marquage nucléaire ne dépasse pas 35 grains (ROGERS, 1967a). Au-delà, des erreurs inévitables rendent discutables l'intérêt de l'étude quantitative. Cette limite peut être néanmoins légèrement reculée sous certaines conditions (cellules volumineuses, émulsions à gros grains, observateur entraîné).

La mesure par photométrie des grains d'argent supprime cette limitation tout en accélérant considérablement la cadence des mesures. Ce procédé n'est cependant vraiment intéressant que dans le cas de l'observation microscopique sous éclairage incident (GULLBERG, 1957). Dans ces conditions les grains d'argent apparaissent brillants sur fond noir et le tissu coloré n'interfère pas -ou peu- lors de la mesure de la lumière réfléchie. Sur ces bases, nous avons utilisé l'ensemble microscopique et microphotométrique Ortholux de Leitz,

équipé pour l'éclairage incident (*Ultropak* et *Opak*), avec source à vapeur de mercure et microphotomètre MPV. Dans ce dernier, la présence d'un diaphragme de mesure réglable permet de circonscrire la mesure à une cellule ou à un noyau de cellule (ROGERS, 1961), mais n'élimine pas totalement l'influence des sources parasites comme la lumière réfléchie par les plages marquées très voisines, ou encore la réflexion diffuse du tissu coloré (DORMER et al., 1966). Cependant, après étalonnage préalable, les erreurs qui en résultent restent toujours inférieures à celles qui entachent le comptage visuel, tandis que les cadences de mesure sont multipliées au moins par 10. Ce perfectionnement comporte néanmoins un inconvénient principal qui tient à la nécessité pour chacune des mesures d'alterner l'éclairage strictement incident (fond noir) nécessaire à la mesure photométrique et l'éclairage mixte d'observation (incident + transmis) qui, seul, permet de juger de la correspondance entre les grains et l'objet cellulaire marqué. Ce problème a été résolu par un procédé qui autorise l'observation continue de la préparation en lumière transmise et, simultanément, la mesure sélective des grains d'argent. Le principe est d'éclairer la préparation en lumière transmise jaune-orangée et de placer un filtre bleu sur le trajet de l'éclairage incident. Un filtre spectral comparable à ce dernier est interposé avant le photomultiplicateur, de telle sorte que son domaine de sensibilité soit strictement limité à la lumière réfléchie par les grains, quelle que soit l'intensité de l'éclairage transmis. En conséquence, l'observateur distinguera à la fois les grains d'argent, qui apparaissent bleutés, et les cellules dont les détails cytologiques sont bien rendus en éclairage jaune, tandis que le microphotomètre délivrera en continu la mesure de la lumière réfléchie par les cellules marquées qui passent au centre du champ.

2/ Situation spatiale de l'information radioautographique ;
traitement graphique et numérique :

Après détection du marquage, se pose le problème classique du

positionnement : dans toute analyse de ce type effectuée à fort grossissement, il est en effet inévitable que l'observateur perde la notion de la position précise des détails observés par rapport à la structure d'ensemble. En général, le retour à un faible grossissement donne une approximation de cette position, tandis que le recours aux graduations latérales de la platine (ou autre système équivalent) permet de connaître la position exacte de ce détail par reconstruction de ses coordonnées X-Y. Dans ces deux cas, le temps passé pour traiter une seule de nos coupes variait de 50 à 150 heures, opération représentant l'analyse d'une surface de $300.000.000 \mu\text{m}^2$, ce qui correspond approximativement à l'observation rapide de 50.000 cellules et à la détection ainsi qu'au repérage du marquage pour quelques centaines ou quelques milliers de cellules suivant les cas. La conjugaison d'une table traçante X-Y à la platine du microscope par l'intermédiaire de capteurs de déplacement (BISCONTE, FULCRAND et MARTY, 1968) permet la solution du problème et, à partir de ce dispositif de base, divers perfectionnements furent apportés :

- mémoire de position : elle aide l'observateur à retrouver la position précise d'une cellule ou du centre d'un champ. Ce perfectionnement est pratiquement indispensable dans l'analyse cellule par cellule.
- cartographie proportionnelle ou non proportionnelle : suivant le type de dépouillement effectué, il est utile ou non de faire apparaître l'information de densité en grains d'argent de chaque cellule sur les cartes. Des modifications profondes du système de traçage de la table assument cette fonction.
- ensemble de comptage : cet appareil permet la comptabilisation des cellules au fur et à mesure de l'analyse. La classification dans 8 canaux des cellules marquées en donne directement l'histogramme de répartition.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

I - METHODE DE RADIOAUTOGRAPHIE QUANTITATIVE

RESULTATS

A - Molécules

1/ Influence du mode et des doses d'injection :

Le maximum de concentration de la thymidine injectée apparaît dans tous les cas moins de 10 minutes après l'injection dans le compartiment sanguin. On y retrouve 3 % de la dose injectée si l'administration est effectuée par voie intramusculaire, 8 % par voie intrapéritonéale et 16 % par voie intraveineuse. Ce dernier résultat montre bien la grande rapidité d'élimination de la thymidine du compartiment sanguin. En faisant varier les doses de 20 à 240 μ Ci par rat de 250 g, aucun changement dans ces pourcentages n'a été observé. Dans l'ensemble, la forme de la courbe d'élimination varie peu, hormis le niveau, quel que soit le mode d'injection choisi. Son allure complexe et, surtout, l'existence d'une remontée de la radioactivité rendent impossible sur ces seules bases toute conclusion sur le temps de disponibilité (Pl. I A : courbes R^3H PL IP IV).

2/ Produits de dégradation :

Comme certains auteurs l'avaient noté chez l'Homme (RUBINI et al., 1960, 1962), une rapide transformation de la molécule de thymidine tritiée en eau tritiée s'opère *in vivo*. Chez le Rat, nous avons retrouvé ce phénomène : 3 heures après l'injection, 95 % de la radioactivité du plasma est liée à l'eau tritiée (Pl. I A : courbes R^3H PL IV V0) ; au-delà de cette durée, la quantité

PLANCHE I A

CLEARANCE PLASMATIQUE DE LA RADIOACTIVITE APRES INJECTION DE THYMIDINE TRITIEE

Doses injectées en intrapéritonéale : 20 μ Ci pour 150 g de poids de rat.

Doses injectées en intraveineuse : 10 μ Ci pour 150 g de poids.

R^3H = radioactivité tritiée

PL = plasma

IV = injection par voie intraveineuse

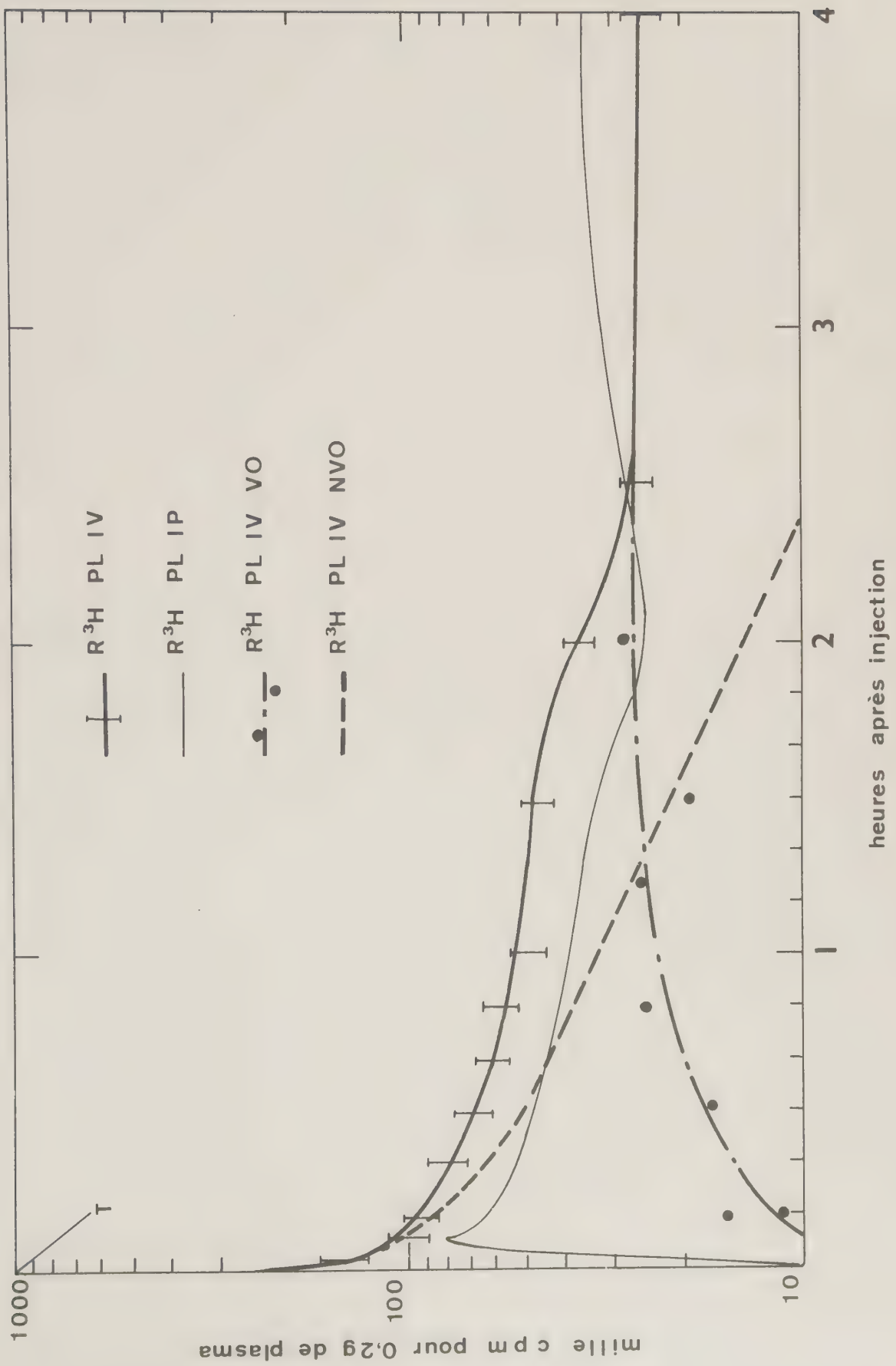
IP = injection par voie intrapéritonéale

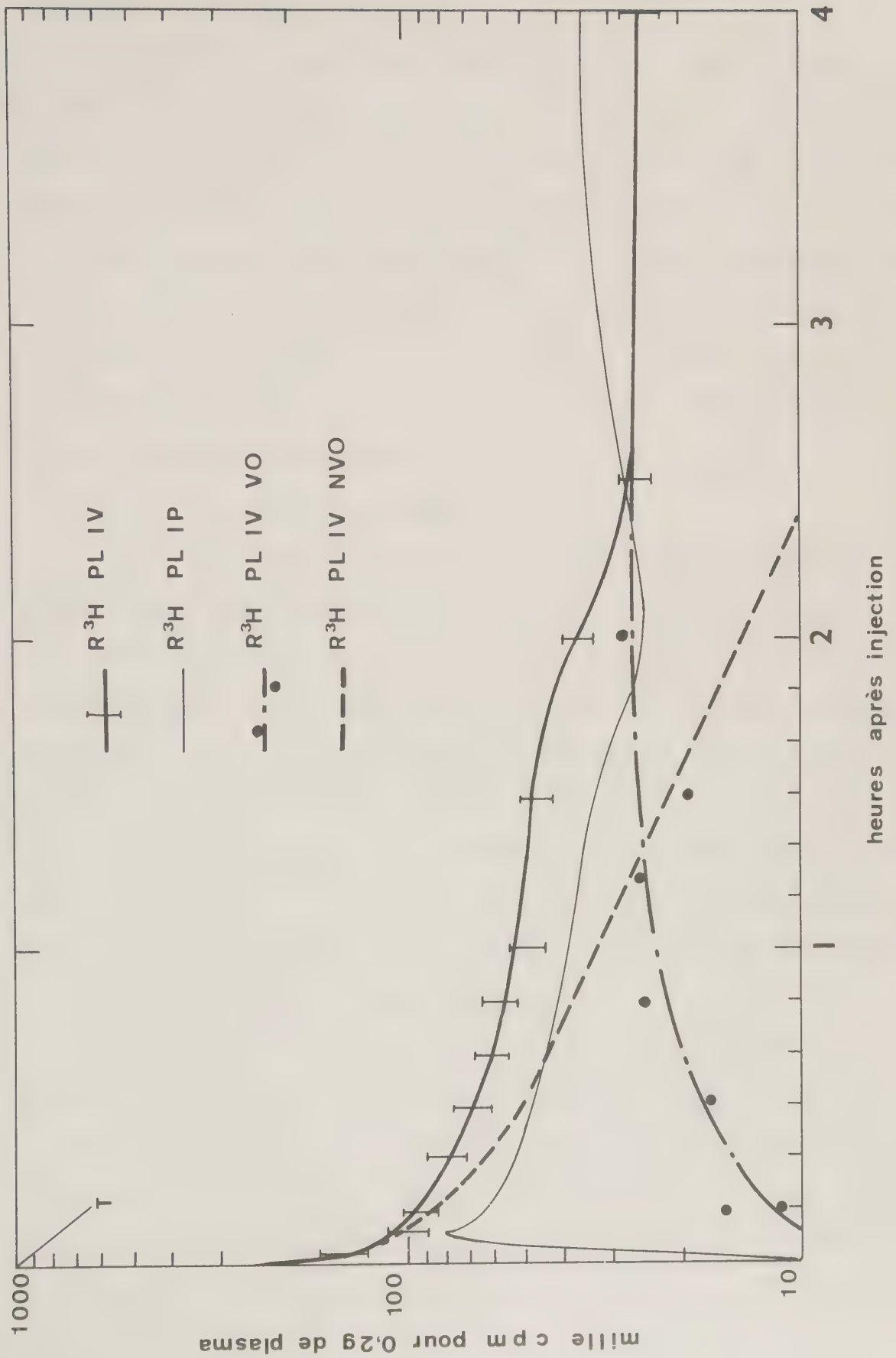
VO = radioactivité volatile

NVO = radioactivité non volatile

T = radioactivité plasmaticque totale (dans 0,2 g).

PL I.A





d'eau tritiée plasmatique reste stable, ce qui indique qu'il y a équilibre avec l'eau tritiée des autres compartiments. Un calcul simple montre à ce moment que l'eau tritiée totale de l'animal représente 30 % de la radioactivité injectée. La demi-vie de cette forme de radioactivité est très lente, environ 2 semaines. A côté de l'eau tritiée, nous avons pu identifier de la thymidine et de l'acide β -amino-isobutyrique (BAIBA). L'élimination de ces deux métabolites est très active et, à eux deux, ils ne représentent jamais plus de 5 % de la radioactivité injectée (Pl. I A : courbes R^3H PL IV NV0). Dans le cas de la thymidine ^{14}C , les métabolites sont identiques mais, dans ce cas, l'essentiel de la radioactivité se retrouve dans le CO_2 expiré.

3/ Processus de déméthylation :

Lorsque le marqueur est placé sur un radical méthyle, on peut toujours craindre une réutilisation de ce radical dans la synthèse des protéines (CLEAVER, 1967). Pour notre part et jusqu'à 3 heures après l'injection, nous n'avons jamais observé de radioactivité liée aux protéines du plasma. D'un autre côté, les résultats obtenus pour la forme méthyle ^{14}C et la forme thymidine 2 ^{14}C sont identiques dans ces expériences pour des temps courts (3 heures). Au total, compte tenu de l'élimination urinaire rapide de la radioactivité (50 % au bout de 3 h 50 ; BISCONTE, 1967), il est vraisemblable que la réutilisation du radical méthyle ne peut être qu'un phénomène négligeable.

4/ Temps de disponibilité :

Une minute après son administration intraveineuse, 80 % de la radioactivité du précurseur ont quitté le compartiment sanguin. Une heure après l'injection, la fraction plasmatique non volatile, c'est-à-dire principalement la thymidine, la thymidine et le BAIBA, ne représente que 2,6 % de la dose administrée. Même si l'on suppose que ce pourcentage ne soit le fait que de la seule thymidine, les cellules entrant en phase prémitotique à ce moment ne

pourraient donc, dans le meilleur des cas, posséder que 2 ou 3 grains d'argent, en supposant que le maximum des grains identifiés par radioautographie soit de 100 par cellule. Or ce chiffre est inférieur à 4, valeur considérée comme minimale pour une évaluation quantitative. En réalité la thymidine ne représentant qu'environ le tiers de la fraction non volatile le temps de disponibilité serait donc proche de 20 minutes. HUGHES et al. (1958) l'estiment compris entre 30 et 60 minutes chez la Souris, et, RUBINI et al. (1960) de l'ordre de 10 minutes chez l'Homme.

5/ Quantité de thymidine incorporée :

Un bilan d'utilisation a été dressé et, compte tenu de la radio-activité présente dans le plasma, l'urine et dans l'eau totale du corps, il semble que seuls 15 à 20 % de la thymidine injectée soient incorporables. Il est possible que, chez la ratte gestante, ce pourcentage soit plus élevé en raison d'un taux d'incorporation plus important, lié aux propriétés prolifératives des tissus embryonnaires. Chez l'Homme, KRISS et al. (1965, cités par CLEAVER, 1967) estiment que 17 % seulement de précurseur sont incorporés dans l'ADN.

B - Centrifugation des lames

1/ Influence des facteurs extérieurs :

Ils n'ont qu'une influence réduite lorsque la température se situe entre 20°C et 30°C et l'humidité relative entre 45 et 60 %.

2/ Influence des paramètres liés à la technique :

a/ Dilution de l'émulsion : inégalités d'épaisseur inévitables si la dilution dépasse 1 : 3. Optimum 1 : 1.

b/ Température de fusion de l'émulsion : fixée classiquement à 42°C.

c/ Temps de trempage : 4 secondes.

d/ Temps et vitesse de centrifugation : Pour ces deux paramètres, une centrifugation insuffisante conduit à une répartition légèrement hétérogène de l'émulsion. L'analyse des courbes de répartition (BISCONTE, 1967) permet de tirer les conclusions suivantes :

* A vitesse de centrifugation constante (1000 tours/mn), l'augmentation des temps de centrifugation permet d'obtenir une épaisseur d'émulsion minimale, dès 30 secondes de rotation.

* A temps constant, la minceur de l'émulsion est proportionnelle à l'accélération de vitesse. Une limite est atteinte vers 5000 tours, des ruptures de lame pouvant alors se produire.

De ces deux constatations, on peut déduire les paramètres moyens de centrifugation : 1 minute en accélération jusqu'à 2000 tours/mn.

3/ Homogénéité des résultats :

Sur les lames, la répartition de l'émulsion est régulière avec un léger épaississement (10 à 15 %) dans le sens où s'exerce la force centrifuge. Pour un même lot de lames, les épaisseurs sont identiques à 2 % près en moyenne, 5 % dans le cas le plus défavorable. Dans des lots différents traités identiquement, les variations trouvées sont faibles : en moyenne, 4 %.

C - Analyse radioautographique

1/ Détection du marquage radioautographique :

a/ Choix de l'optique :

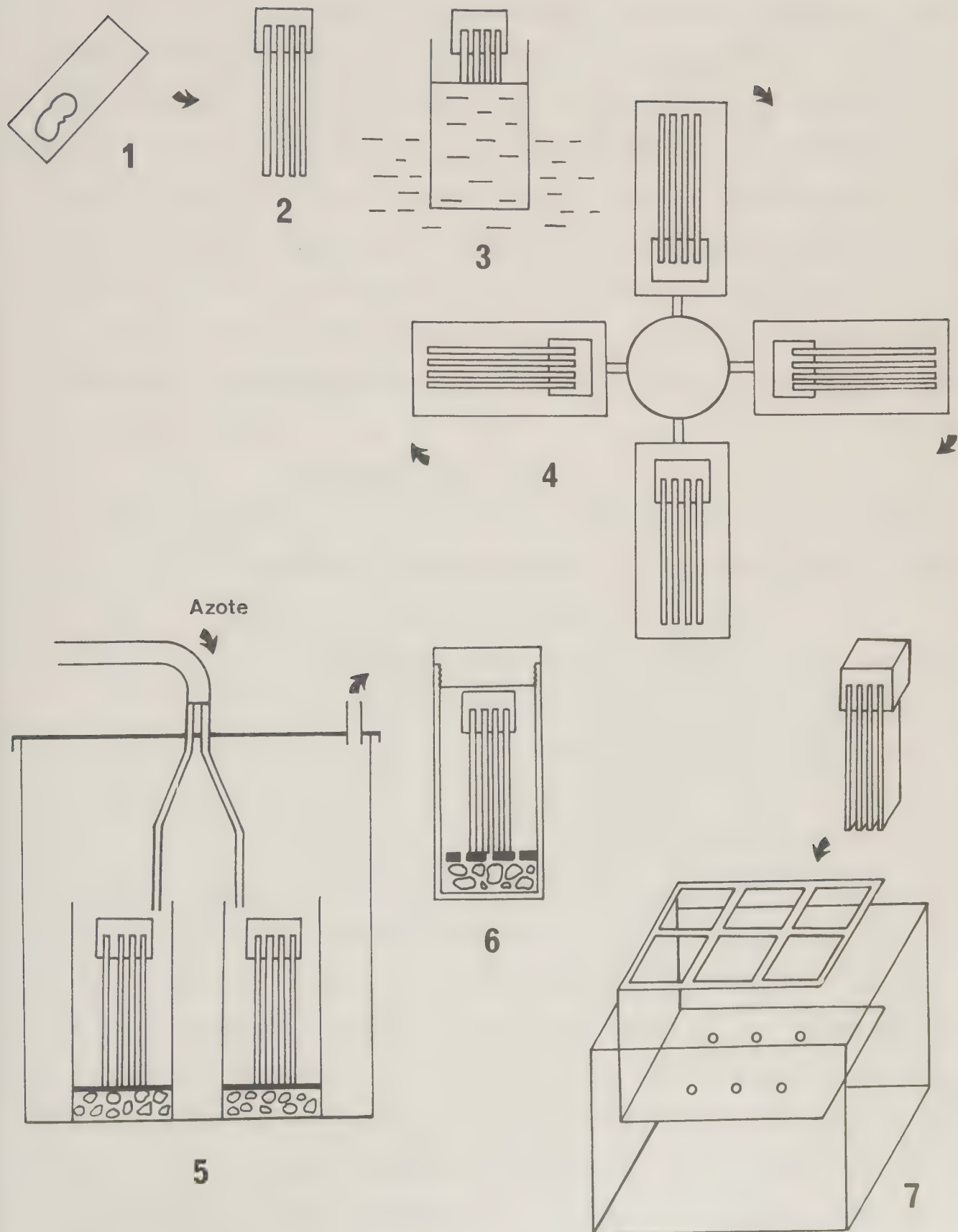
Nous avons utilisé 2 types d'objectifs pour éclairage incident. La série des objectifs *ultropak* se caractérise par un miroir illuminateur annulaire et les rayons incidents arrivent obliquement sur la préparation.

PLANCHE I B

PROCEDE DE COULAGE DE L'EMULSION RADIOAUTOGRAPHIQUE PAR CENTRIFUGATION
(SEQUENCES DES OPERATIONS).

- 1°/ Lame de verre portant la coupe histologique marquée.
- 2°/ Les lames sont groupées par 4 dans les griffes plastiques.
- 3°/ Les lames sont plongées dans l'émulsion rendue liquide par chauffage au bain-marie.
- 4°/ Chaque ensemble de 16 lames est centrifugé durant une minute à 2000 tours/minute.
- 5°/ Séchage complémentaire des 16 lames à l'azote sec dans des récipients contenant de la drierite.
- 6°/ Fermeture étanche des récipients contenant les lames en atmosphère d'azote en vue de la pose.
- 7°/ Les opérations de révélation, fixation et coloration se déroulent dans des supports permettant de traiter 24 lames à la fois.

PL I.B



La série *Opak* possède un miroir semi-transparent axial et les rayons incidents arrivent perpendiculairement à la préparation ; de plus, un diaphragme intégré permet de faire varier le diamètre du champ éclairé. Comme ROGERS (1961) puis DORMER (1966) l'ont signalé, la série *Opak* est plus adaptée aux mesures quantitatives. En effet, ses caractéristiques réduisent beaucoup les phénomènes de lumière diffusée. Les objectifs *Ultropak* sont au contraire de meilleure qualité pour l'observation histologique et conviennent pour les approches qualitatives, bien que, en prenant certaines précautions, il soit possible de les utiliser en quantitatif. Pour les deux types d'objectifs, les meilleurs résultats s'obtiennent aux forts grossissements et en immersion (*Opak* : 105 x ; *Ultropak* : 75 x et 100 x).

b/ Choix des filtres :

Le choix de ceux-ci a été guidé par trois impératifs :

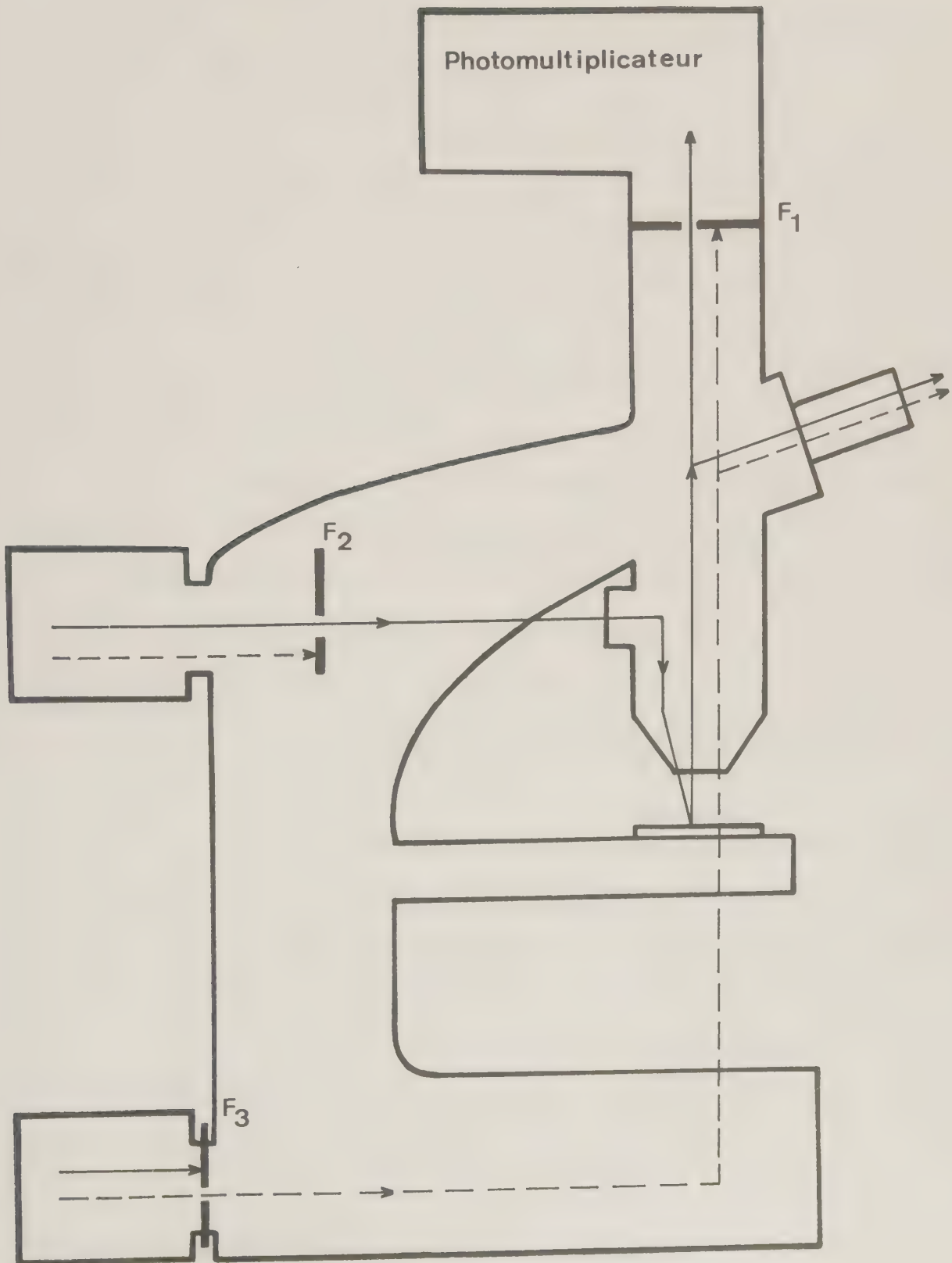
- * Le rapport lumière réfléchie par les grains/lumière diffusée par le tissu doit être maximum.
- * Le photomètre doit mesurer sélectivement la lumière réfléchie par les grains et rester insensible à la lumière transmise.
- * L'observateur doit distinguer à la fois les grains d'argent et les détails cytologiques sous-jacents.

Nous avons obtenu un tel résultat empiriquement, en conditions d'éclairage transmis jaune, filtré au-dessous de 520 nm (Pl. I C : Filtre F_3) et d'éclairage incident spectral bleu à 437-11 nm (Pl. I C : Filtres F_1 et F_2). L'indépendance des deux éclairages est telle que toute variation d'intensité de la lumière transmise est sans retentissement sur les indications photométriques. On peut même, en majorant l'éclairage transmis par rapport à l'éclairage incident, obtenir une préparation d'aspect classique avec des grains noirs sur fond clair tout en continuant à effectuer l'enregistrement photométrique à partir de la lumière réfléchie par les grains, cette dernière devenant invisible pour l'observateur.

PLANCHE I C

L'ANALYSE MICROPHOTOMETRIQUE PAR ECLAIRAGE SPECTRAL.

- En trait pointillé, le trajet du faisceau d'éclairage transmis jaune après filtrage à 520 nm (filtre : F_3).
- En trait continu, le trajet du faisceau d'éclairage incident spectral bleu après filtrage à 437-11 nm (filtre F_2).
- Devant le photomultiplicateur, un filtre bleu 437-11 (filtre F_1) ne laisse passer que la lumière bleue tandis que l'observateur distingue les deux types de lumière.



c/ Validité de la méthode :

* Relation entre le nombre de grains et la valeur photométrique totale (L_t)

Il existe une relation linéaire entre la valeur photométrique lue sur le galvanomètre et le nombre réel de grains (ROGERS, 1967b). Les caractéristiques de cette courbe dépendent de celles de l'installation et des conditions d'utilisation (éclairage, amplification, etc...). Il est donc nécessaire de procéder à des étalonnages. Nous avons ainsi choisi pour établir notre courbe L_t (Pl. I D, fig. 2) une préparation témoin, et repéré un certain nombre de cellules de même diamètre, dont le marquage avait été évalué par comptage visuel au microscope ou après agrandissement photographique lorsque le nombre des grains dépassait 40. La courbe obtenue est une droite qui ne passe pas par l'origine, ce qui signifie qu'en l'absence de tout marquage il existe une déviation photométrique de fond. Elle est liée à la lumière diffusée par le tissu et le colorant, d'une part, et les grains d'argent voisins, d'autre part.

* Caractéristiques de la lumière diffusée par le fond (L_d)

A diamètre de mesure constant, pour un même tissu coloré et non marqué, la lumière diffusée est pratiquement indépendante de la nature du fond cellulaire (noyau ou cytoplasme). Les variations trouvées n'atteignent pas 4 % dans nos conditions expérimentales (objectifs *opak*, éclairage spectral). Si le diamètre de mesure varie, les valeurs photométriques de L_d évoluent proportionnellement sauf pour les très petites ouvertures, où l'on constate que la courbe de réponse du photomultiplicateur n'est pas linéaire (Pl. I D, fig. 1). Ce fait n'est pas gênant en pratique, car les valeurs de lumière diffusée pour lesquelles ce phénomène devient sensible correspondent à des quantités de lumière extrêmement faibles (l'équivalent de la lumière réfléchie par un ou deux

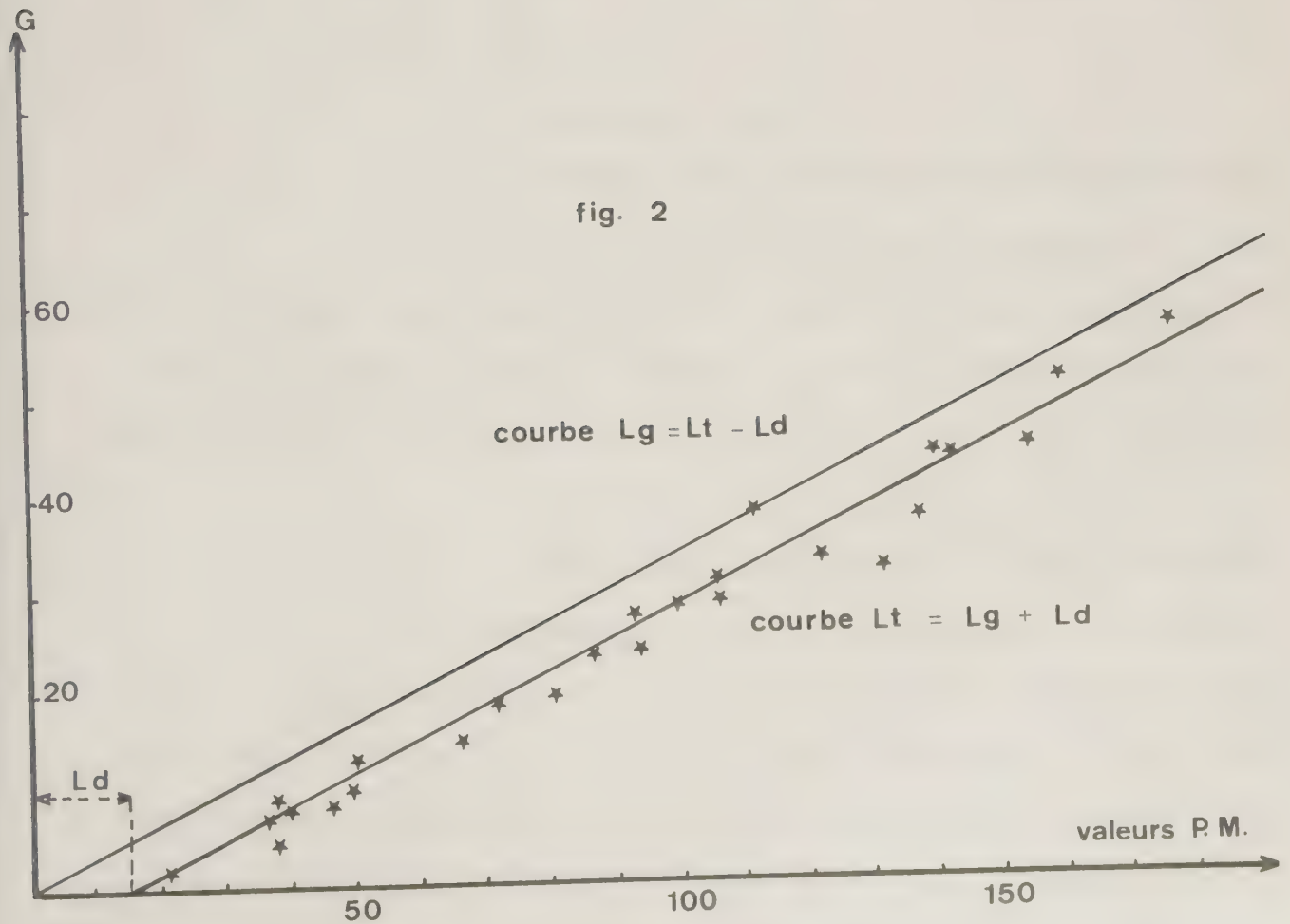
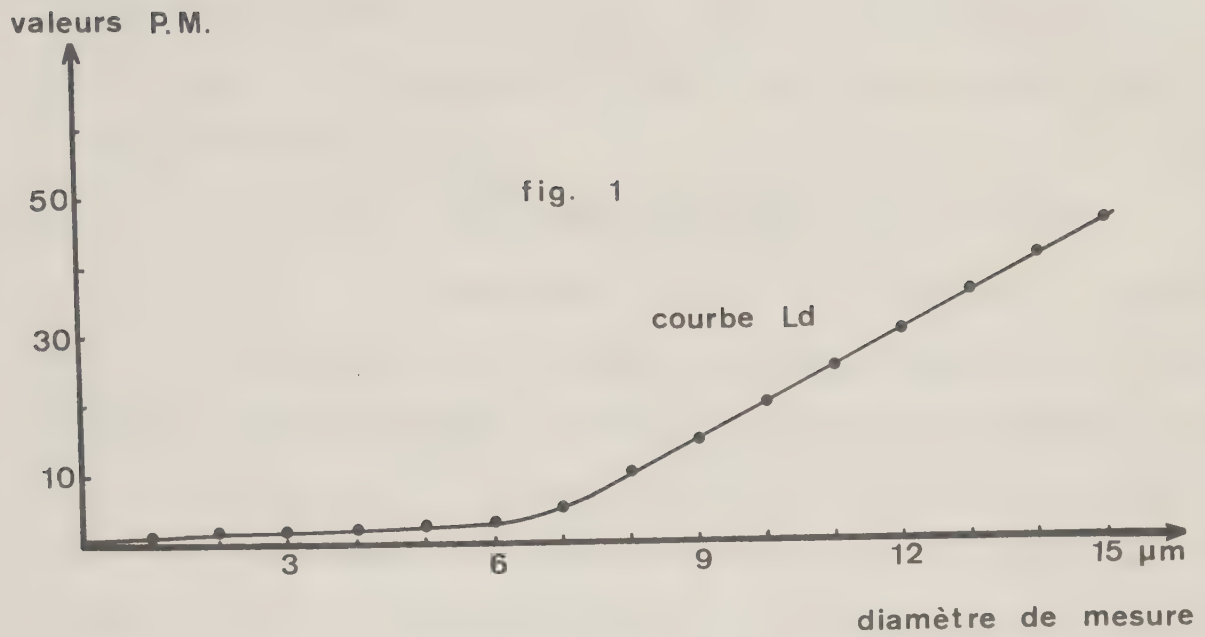
PLANCHE I D

COURBES PHOTOMETRIQUES D'ETALONNAGE.

Fig. 1 - Courbe de lumière diffusée (L_d) en éclairage spectral par un fond coloré non marqué lorsque le diamètre du diaphragme de mesure varie. PM = valeurs photométriques arbitraires, lues sur le galvanomètre à spot. La courbe met en évidence la non-linéarité du photomultiplicateur au dessous d'un seuil. Ce seuil est atteint pour des diamètres de 6 μm . Il correspond à des valeurs très faibles de lumière diffusée, équivalentes à celles obtenues par réflexion sur 1 ou 2 grains.

Fig. 2 - Relation entre la déviation photométrique et le nombre réel de grains (G). La courbe L_t est tracée à partir des valeurs PM obtenues par mesure de 26 plages marquées dont le nombre de grains, variant de 3 à 58, est déterminé par comptage visuel direct ou après agrandissement photographique. La droite L_t ne passe pas par l'origine en raison de la déviation L_d qui est ici constante, le diamètre mesuré étant fixe. La courbe d'étalonnage réelle L_g s'obtient par translation de L_t . La pente de la droite dépendant des conditions expérimentales (taille des grains, éclairage, amplification), un étalonnage rapide est nécessaire lorsque ces conditions varient.

PL I.D



grains). En conséquence pour obtenir l'indice de lumière réfléchi par les grains (L_g), il suffit de déduire L_d de la valeur photométrique totale (L_t) suivant une relation simple.

* Lumière diffusée par les grains (L_g)

Comme DÖRMER (1966) l'avait signalé, les plages de grains ne réfléchissent pas seulement la lumière en direction verticale ; une certaine quantité de lumière est réfléchi latéralement en formant une sorte d'auréole. La planche I E illustre ce phénomène : les courbes L_g , après correction de L_d , continuent anormalement à croître au-delà du diamètre des plages marquées. On constate également que, sur ces parties de courbes, la forme varie beaucoup suivant la densité des grains. Une ouverture du diaphragme un peu supérieure au diamètre de la plage contribuera donc à l'intégration de cette lumière diffusée dans la valeur photométrique L_g .

d/ Protocole de mesure :

* Mesures sur une population cellulaire homogène

Si la population cellulaire est très homogène, le diamètre du champ de mesure peut être fixé au départ. Dans ce cas, après s'être placé sur une plage de tissu non marquée il suffit de refaire le zéro de l'appareil de mesure. Les valeurs lues par la suite correspondront directement à L_g .

* Mesures sur une population cellulaire hétérogène

Pratiquement, la notion d'homogénéité est relative et la distribution des diamètres d'une telle population suit naturellement une loi statistique. Si le matériel provient de coupes histologiques, l'éventail des valeurs trouvées s'élargit encore par le fait que les plans de coupe sont quelconques par rapport au centre des cellules. En conséquence, beaucoup de cellules

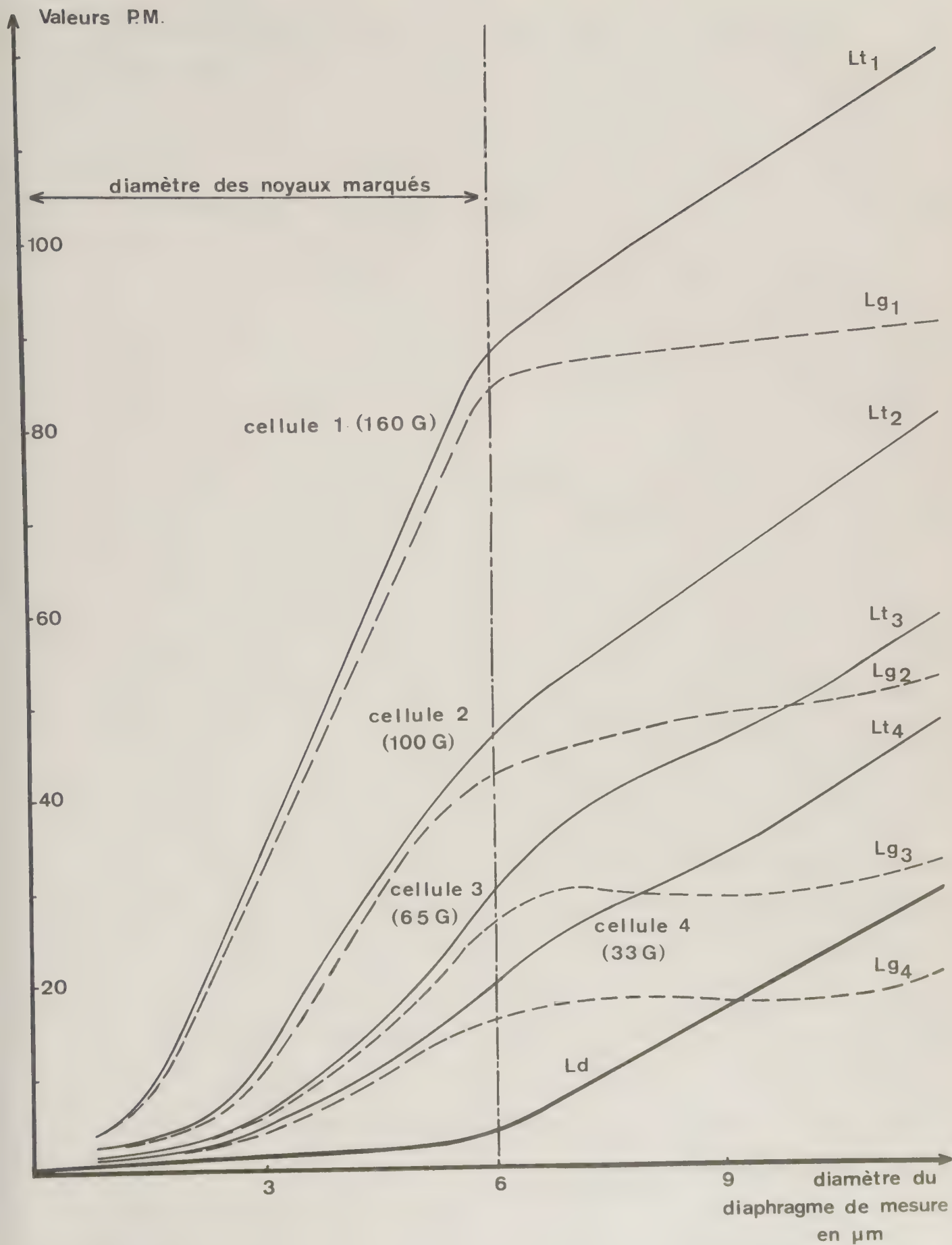
PLANCHE I E

COURBES PHOTOMETRIQUES D'ETALONNAGE.

Courbes de lumière totale (Lt) obtenues par éclairage spectral sur 4 noyaux cellulaires colorés et marqués. Le diamètre des noyaux a été choisi constant (6 μ m) tandis que le nombre de grains est différent (de 33 à 160 grains).

Les courbes Lt mettent en évidence l'influence de la lumière diffusée Ld dont la courbe a été rappelée au bas de la planche. Par soustraction, on obtient les courbes Lg. On constate qu'au delà du diamètre des noyaux marqués les courbes Lg continuent à croître, ce qui révèle l'existence d'une auréole de lumière diffusée par les grains d'argent. Le phénomène varie considérablement suivant la densité des grains et rend difficile une correction simple.

PL I.E



présentent un diamètre apparent diminué (ABERCROMBIE, 1946 ; EBBESSON et TANG, 1965 ; GLASER et UDE, 1968 ; APPLETON et al., 1969). Enfin, dans le système nerveux, il est classique de distinguer plusieurs types de neurones différenciables par leur diamètre (petites et grandes pyramidales, neurones étoilés). Il en résulte que les mesures nécessitent une adaptation du diaphragme à chaque diamètre cellulaire ou nucléaire. De toute valeur photométrique totale (L_t) ainsi trouvée, on retranche la valeur L_d obtenue secondairement en déplaçant le champ de mesure sur une partie non marquée de la préparation. Cette méthode présente des inconvénients ; en particulier, elle est longue car, pour chaque cellule, l'observateur doit alterner l'observation binoculaire et le réglage microphotométrique. La méthode avec diamètre de champ de mesure constant que nous utilisons est beaucoup plus rapide. Après échantillonnage de la population cellulaire, le diamètre du diaphragme de mesure est fixé en fonction de la taille maximale des plages à mesurer. Ainsi, pour des cellules dont la taille des noyaux se répartit de 5 à 10 μm , le diaphragme sera réglé à 12 μm . Les réglages d'éclairage et d'optique étant fixes et ne nécessitant plus le va-et-vient habituel entre l'installation d'observation binoculaire et l'appareil de mesure, l'observateur analysera en continu les cellules en les plaçant successivement au centre d'un réticule gradué placé dans un des tubes du binoculaire. Une correction de lumière diffusée devra néanmoins intervenir pour chaque cellule et sera fonction de la différence qui existe entre le diamètre de mesure et le diamètre de la plage marquée. Dans nos conditions expérimentales, ce coefficient de correction de L_d correspond à 6 grains par μm de différence. A titre d'exemple, supposons que la plage mesurée soit de 8 μm pour un diamètre de mesure de 12 μm . La correction consistera à retrancher 4 fois 6 grains ($12 \mu\text{m} - 8 \mu\text{m} = 4$) de la valeur exprimée par le galvanomètre. Si cette valeur est de 120 grains, le nombre réel de ceux-ci pourra être estimé à $120 - 24 = 96$ grains.

Dans la pratique, le diamètre de la plage se lit directement sur le réticule gradué et la correction qui en découle est instantanée. Un des avantages de la méthode est qu'elle permet paradoxalement des mesures plus précises que ne l'autorisent les mesures à diamètre strictement adapté (en intégrant la lumière diffusée par les grains).

2/ Situation spatiale de l'information radioautographique :

a/ Repérage sur table traçante (Pl. I F, fig. 1)

La liaison entre la table traçante 7090 Hewlett-packard et la platine du microscope est assurée par deux capteurs à induction (Hewlett-packard 7 DCDT 500). Le scripteur de la table X-Y se comporte comme un répéteur de position et signale à tout moment la situation du champ observé par rapport à l'ensemble de la structure. Il faut toutefois avoir tracé au préalable les contours de la coupe et de certains repères majeurs en suivant ceux-ci à faible grossissement, tandis que le scripteur frappe en continu. En agissant sur le coefficient d'amplification de la table, il est ainsi possible de considérer comme structure d'ensemble une coupe de cerveau dans sa totalité (faible amplification) ou inversement, une seule cellule (forte amplification).

b/ La mémoire de position (Pl. I G, fig. 1)

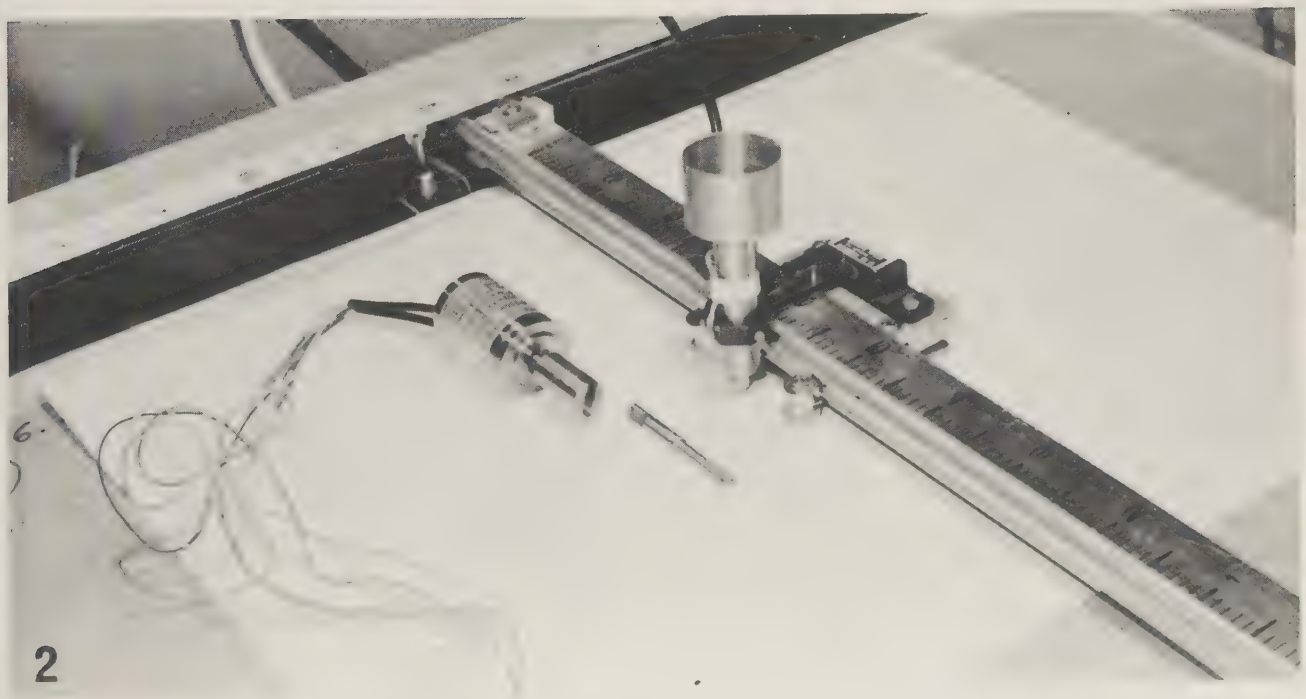
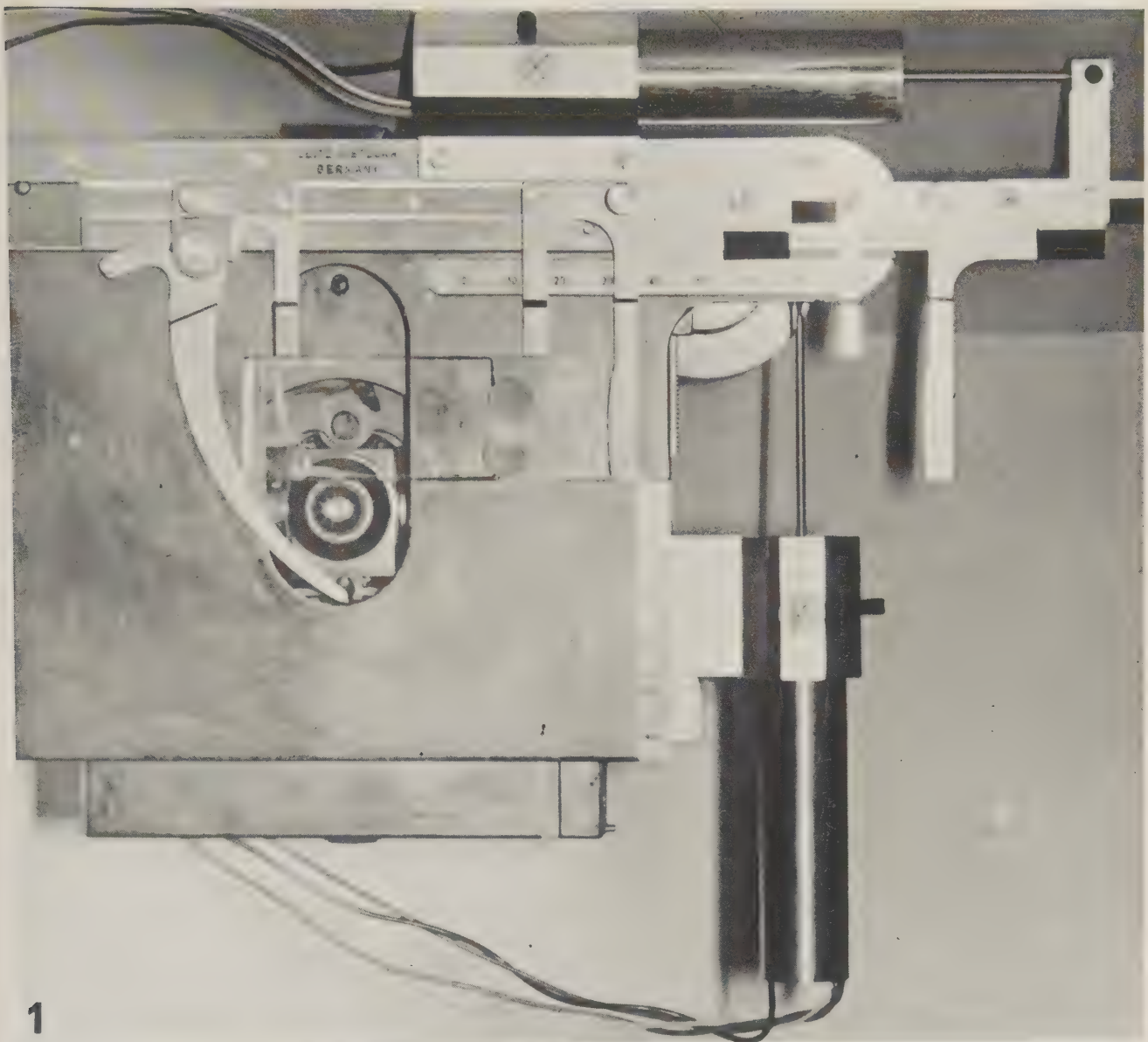
Dans la pratique, l'observateur analyse des unités de surface qui correspondent aux champs microscopiques. Les cellules marquées appartenant à un champ sont mesurées successivement, c'est-à-dire en les plaçant l'une après l'autre au centre du champ, dans le diaphragme de mesure. De ce fait, au cours de ces opérations, il est très difficile de ne pas "oublier" quelques cellules ou encore de ne pas compter la même plusieurs fois. En outre, l'observateur a beaucoup de difficultés à se rappeler les limites exactes du champ choisi. Pour pallier ces inconvénients, nous avons réalisé un dispositif qui conserve en mémoire une position précise, en l'occurrence le centre du champ

PLANCHE I F

CARTOGRAPHIE PAR TABLE TRACANTE.

Fig. 1 - Montage des capteurs de déplacement sur la platine du microscope
Ortholux.

Fig. 2 - Vue éclatée du scripteur pas à pas monté sur la table traçante. De gauche à droite : le micromoteur pas à pas avec sa chape de guidage qui transmet les rotations au doigt du scripteur ; le doigt du scripteur. Le corps du scripteur est en place ; il contient le solénoïde responsable des mouvements verticaux du doigt de scripteur.



choisi. Sur l'écran d'un répéteur cathodique, cette position correspond à un spot placé au centre d'un réticule. Chaque déplacement de la platine du microscope en vue d'une mesure de cellule sera objectivé par un déplacement du spot. Après chaque mesure, pour être certain de se retrouver dans la position initiale, il suffira de manipuler la platine de telle sorte que le spot soit replacé au centre du réticule. Un marquage temporaire sur l'écran de l'oscilloscope permet de ne laisser passer aucune cellule, de n'effectuer aucune mesure en double et de ne jamais déborder du cadre du champ. Une fois les mesures terminées, l'observateur change de champ et, par une simple pression sur un bouton, remet à zéro le spot, qui se replace au centre de l'écran.

Les mémoires sont constituées par deux condensateurs à forte capacité. La tension délivrée par les capteurs de position peut ainsi être mise en mémoire par télécommande. Toute variation de position par rapport à la position initiale introduira une différence de potentiel entre les nouvelles tensions et les tensions de référence en mémoire. C'est cette différence qui sera à l'origine du déplacement du spot. Comme dans tout système capacitif il existe un courant de fuite qui aboutira à une dérive du spot. Dans notre appareillage, l'électronique a été étudiée pour que cette dérive ne soit pas sensible pendant 10 minutes, ce qui est très largement suffisant pour effectuer les mesures à l'intérieur d'un champ.

3/ Représentation graphique :

Initialement, les tables traçantes étaient munies de scripteurs à encre ; mais le fonctionnement de ces systèmes n'est pas satisfaisant pour des travaux de frappe point par point. Aussi avons-nous modifié l'ensemble de telle sorte que le scripteur agisse par l'intermédiaire d'une pointe sèche sur un papier carbone placé sous un calque. Les points ainsi frappés apparaissent parfaitement par transparence. Nous avons également utilisé avec de bons résul-

PLANCHE I G

PRESENTATION DE L'APPAREILLAGE.

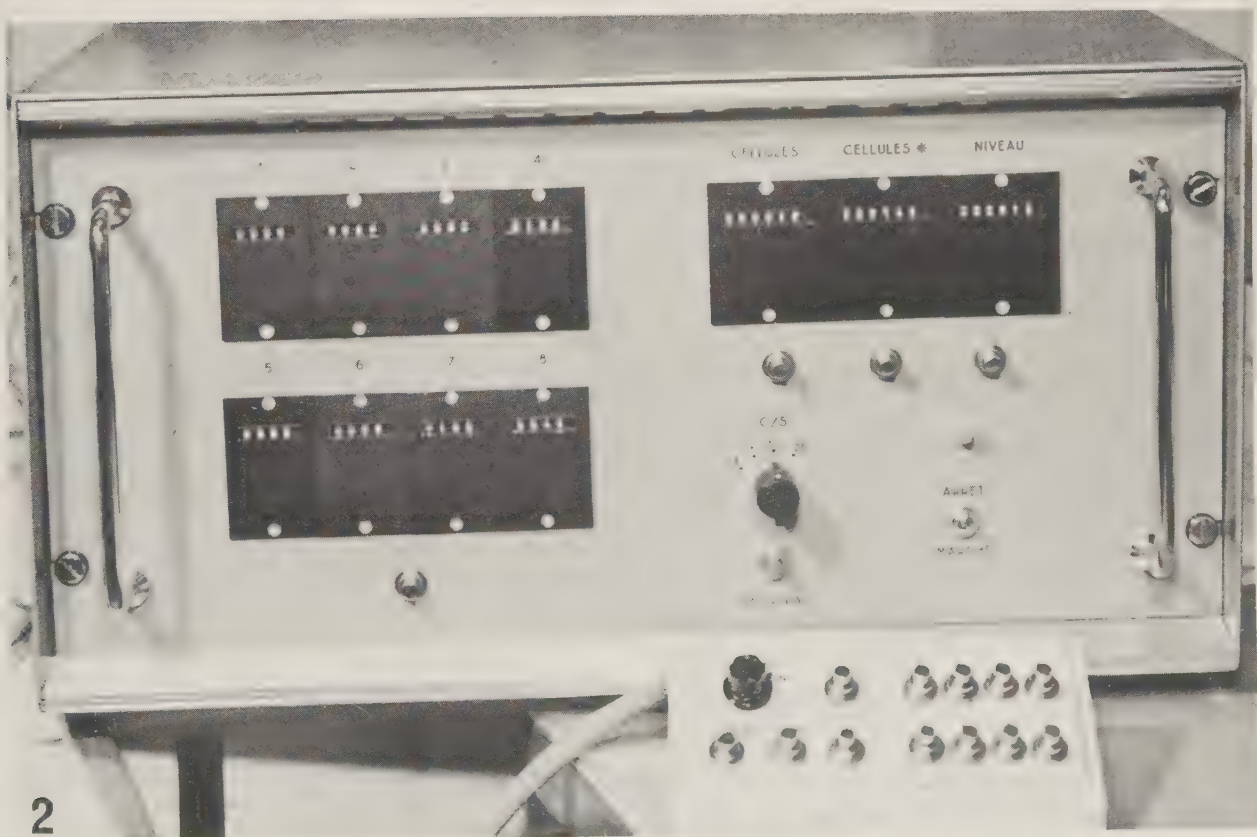
Fig. 1 - Ensemble de l'appareillage ; de gauche à droite :

- Alimentation stabilisée des capteurs.
- Table traçante avec son scripteur monté.
- Ecran cathodique utilisé en tant que sortie des mémoires de position.
- Ensemble de comptage avec le boîtier de télécommande.
- Microscope *Ortholux* avec le dispositif d'éclairage par lumière incidente ; au-dessus, le microphotomètre MPV et l'oculaire de réglage.

Fig. 2 - Ensemble de comptage et boîtier de télécommande.

On distingue à gauche du panneau le bloc des 8 compteurs et le poussoir de remise à zéro. A droite, les compteurs de cellules non marquées, de cellules marquées, et de total des grains. Dessous, les poussoirs correspondants de remise à zéro, le réglage de la fréquence de frappe en continu, la commande du moteur pas à pas, et l'interrupteur général.

Le boîtier de télécommande comprend un bouton de fonction de frappe, qui permet de frapper en manuel coup par coup, en manuel en continu (à fréquence variable) ou en automatique en relation avec l'inscription dans les compteurs. On distingue un poussoir marqué "champ" qui commande la mise en mémoire de coordonnées X-Y, le poussoir de frappe coup par coup, les deux poussoirs (unité et dizaines) de comptage des cellules non marquées et les 8 poussoirs correspondant aux 8 classes de cellules marquées.



tats des papiers spéciaux à encre incorporée.

La possibilité de télécommander facilement le fonctionnement du scripteur de la table X-Y permet la cartographie semi-automatique. En effet, puisqu'il est nécessaire de placer au centre du champ du microscope toute cellule dont on veut évaluer microphotométriquement le marquage, il suffit de commander le scripteur à ce moment pour que cette cellule s'inscrive dans sa position véritable sur la table X-Y. Ultérieurement, il nous parut utile de coupler l'installation de cartographie avec le dispositif microphotométrique à l'origine de la quantification cellulaire, la liaison entre cette information photoélectrique et la commande du "plotting" chargé de pointer chaque cellule marquée pouvant s'envisager en tout ou rien (seuil) ou en proportionnel (points plus ou moins "marqués" en fonction du nombre de grains).

a/ Techniques :

* Cartographie non proportionnelle (Pl. I H, fig. 1)

L'observateur peut télécommander le pointage graphique d'un détail quelconque sans que son regard ne quitte la préparation. Il suffit de disposer d'une commande à pied ou encore à main par bouton poussoir, située près du microscope, pour que chaque manipulation fasse apparaître un point sur la carte. On peut adopter également le tracé point par point à la place du tracé continu obtenu par un scripteur à encre pour simplifier les manipulations. Dans ce cas, nous avons réalisé un dispositif électronique qui commande périodiquement la frappe du scripteur. La fréquence en est réglable de façon progressive entre 1 et 20 coups par seconde ; en général, les contours de coupe se tracent à 10 c/s.

* Cartographie proportionnelle (Pl. I H, fig. 2)

Ce mode opérationnel est basé sur l'utilisation de symboles d'impression différents, placés sur un même bloc, mais la complexité mé-

PLANCHE I H

TECHNIQUES ET METHODES DE CARTOGRAPHIE.

Fig. 1 - Coupe sagittale de cerveau de rat marqué à 14,5 jours.

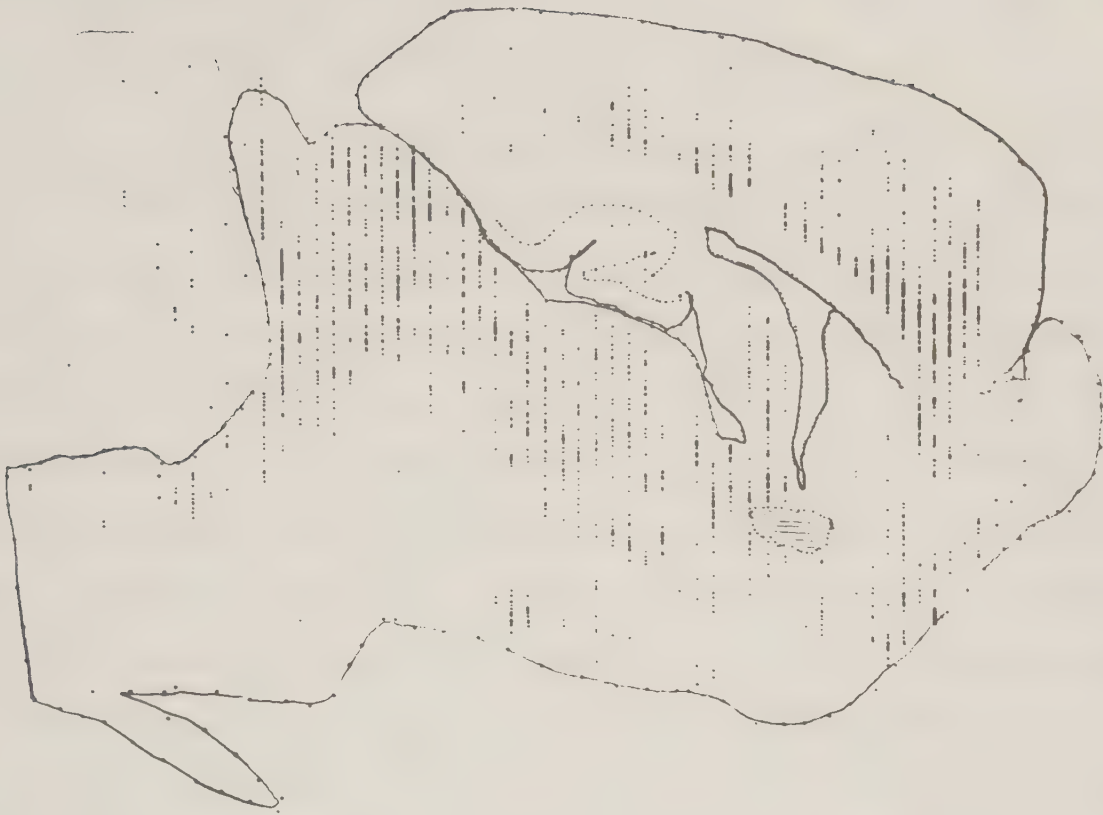
Technique : Cartographie non proportionnelle. Chaque cellule marquée est représentée par un même symbole, quel que soit son niveau de marquage.

Méthode : Cartographie sur axe Y. Les cellules marquées sont alignées sur l'axe Y de scanning. Leurs coordonnées Y sont exactes mais les coordonnées X sont modifiées d'un demi champ microscopique au maximum.

Fig. 2 - Coupe transversale d'un thalamus de rat marqué à 15,5 jours.

Technique : Cartographie proportionnelle par moteur pas à pas. Chaque cellule est représentée sous forme d'étoile dont le nombre de branches est proportionnel au niveau de marquage.

Méthode : Cartographie X-Y. La situation des cellules sur la carte est l'image de leur position réelle.



canique qui en résulte en limite très vite le nombre. Nous avons donc employé un seul symbole de base et étudié deux types de solution :

+ Solution électromécanique (moteur pas à pas) (Pl. I F, fig. 2)

La tête électromagnétique du "plotting" de la table X-Y a été profondément modifiée et un micromoteur pas à pas (40 grammes) est venu coiffer le doigt d'inscription. L'extrémité du doigt a été remaniée et taillée en forme de barre. Un ensemble électronique a été conçu pour commander, d'une part, la rotation du moteur pas à pas (donc du doigt) par fractions de 45° et, d'autre part, pour déclencher la frappe du doigt entre chaque fraction de rotation, suivant une séquence totalement automatique. Il devient ainsi possible de tracer des symboles en forme d'étoiles à 1,2,3,4,5,6,7 ou 8 branches et, ceci, proportionnellement à la quantité de grains d'argent recouvrant chaque cellule (Pl. I H, fig. 2). Cette solution présente l'avantage d'un autre type d'utilisation : l'observateur peut en effet utiliser chacun de ces 8 types d'étoiles comme autant de symboles qualitatifs (par exemple, cellule pyramidale représentée par une étoile à trois branches).

+ Solution électronique

L'inconvénient du système précédent résulte de sa nature électromécanique ; il est relativement lent (1 seconde pour frapper une étoile) et, surtout, rend difficile un changement rapide du doigt du scripteur. Nous avons alors étudié un autre dispositif, qui fonctionne avec un doigt classique, donc interchangeable rapidement. Le paramètre de proportionnalité qui, dans le cas précédent, était exprimé par un nombre variable de branches d'étoile est, ici, reproduit par une frappe en "nuage" de points serrés. Chaque cellule peut donc être représentée par un point ou un groupage de points, dont la densité est directement liée au nombre de grains radioautographiques.

b/ Méthodes :

* Cartographie X-Y (Pl. I H, fig. 2)

La précision inhérente à ce type de cartographie impose à l'opérateur de disposer successivement à la croisée du réticule chacune des cellules marquées puis d'en effectuer le plotting. La mémoire de position se révèle absolument indispensable dans ce cas. En fait, cette procédure complexe a été essentiellement réservée à l'analyse régionale de populations cellulaires plutôt qu'à celle de coupes entières.

* Cartographies sur axe X ou Y (Pl. I H, fig. 1)

Elle trouve sa meilleure indication dans l'analyse de coupes entières ou la quantité d'information implique un traitement simplifié au prix d'une légère schématisation de la représentation graphique (tableau 3).

Disposition réelle des cellules (champ du microscope)	Disposition des cellules après cartographie sur axe Y
A.	A.
B.	B.
C.	C.
D.	D.
E.	E.
F.	F.
G.	G.

Tableau 3 : Schématisation de la cartographie sur axe Y.

* Enregistrement microphotométrique semi-automatique
sur axe :

Sans aucune modification de l'appareillage, il est possible de relier un canal de la table traçante au microphotomètre, l'autre canal

étant relié au capteur de l'un des axes de la platine du microscope. Différentes applications en découlent :

- enregistrement radioautographique cellule par cellule.
- enregistrement radioautographique multicellulaire (une fenêtre rectangulaire intègre la lumière réfléchie par les grains recouvrant plusieurs cellules).
- enregistrements de noircissement (radioautogrammes ^{14}C).
- évaluation de la densité cellulaire après coloration.

* Enregistrement microphotométrique automatique sur axe :

La lecture des valeurs photométriques se fait en général sur galvanomètre à spot. Nous avons placé sur celui-ci 2 cellules photoélectriques qui, par l'intermédiaire de relais, déclenchent le "plotting" dès que le spot du galvanomètre se place entre elles. En déplaçant progressivement les cellules photoélectriques, il est ainsi possible de tracer la carte des isodensités de marquage.

4/ Traitement numérique :

En radioautographie quantitative, il est important de déterminer 2 paramètres très significatifs : le pourcentage de cellules marquées et la moyenne de marquage (moyenne des grains pour l'ensemble des cellules marquées). Un ensemble de comptage a été conçu pour en permettre le calcul semi-automatique (Pl. I G, fig. 2). L'analyse microphotométrique du nombre de grains des cellules marquées concerne environ 2000 cellules par coupe et, en éclairage incident, les mesures durent 2 à 3 secondes par cellules. Chaque cellule est classée suivant sa densité de marquage dans un des 8 compteurs totalisateurs ; parallèlement, au fur et à mesure de l'analyse, les cellules non marquées sont comptées. En fin d'analyse et pour un groupe de champs déterminé, l'observateur relève

sur l'ensemble de comptage :

1°- le nombre total de cellules marquées

2°- le nombre total de cellules non marquées

3°- le total des grains pour l'ensemble des cellules marquées

4°- l'histogramme à 8 classes représentatif du nombre de cellules par catégorie de densité de marquage.

La marche du plotting de la table traçante X-Y peut être à volonté couplée à l'ensemble de comptage et l'inscription d'étoiles à 1,2,... 8 branches est fonction du classement des cellules dans les classes 1,2,...8.

DISCUSSION

A - Molécules :

Comme RUBINI et al. (1962) l'ont montré chez l'Homme, la thymidine tritiée se transforme rapidement et abondamment en eau tritiée chez le Rat. Ceci met en évidence l'importance des phénomènes d'échange isotopique pour l'atome d'hydrogène ou de tritium. Cependant, les caractéristiques de nos expérimentations rendent la présence d'eau tritiée peu gênante. En effet, les délais de survie après l'injection et l'existence de traitements histologiques en phase aqueuse suffisent à éliminer totalement l'eau tritiée. Quant aux autres métabolites (thymine et BAIBA), ils ne représentent que 5 % de la radioactivité (3 % chez l'Homme, RUBINI et al., 1960, 1962). CLEAVER (1967) signale l'importance du processus de réutilisation du radical méthyle dans la synthèse des protéines. Nous n'avons rien noté qui aille dans ce sens, mais il semble certain qu'une partie du marquage radioautographique de fond soit d'origine métabolique. En effet, nous avons remarqué que la valeur de base (CLAES, 1968) du voile de fond général (background) augmentait lorsque les marquages cellulaires étaient intenses, ce qui suggère l'existence d'une telle relation métabolique. Mais, ce phénomène pourrait ressortir à une autre cause, le marquage de la fraction cytoplasmique de l'ARN, éventualité déjà envisagée par CLEAVER (1967). L'objectivité impose cependant de signaler que le marquage de l'ADN peut intervenir bien après l'injection du précurseur par réutilisation de l'ADN marqué des cellules mortes (WIMBER, 1964). De toute façon, ces réserves ne mettent absolument pas en cause la grande spécificité du marquage de l'ADN par la thymidine et son inocuité (AMANO et LEBLOND, 1959 ; FICQ, 1961 ; WAND et ZEUTHEN, 1967).

B - Centrifugation des lames :

Ce procédé ne doit pas être confondu avec la centrifugation utilisée

comme moyen de sédimentation des émulsions radioautographiques (DOHLMAN et al., 1964). Pour notre part l'objectif était d'obtenir une bonne régularité de répartition de l'émulsion sur les lames histologiques conjointement à une grande rapidité opérationnelle. La reproductibilité des résultats entre les différents lots est très bonne. En outre, en faisant varier les paramètres de dilution et de centrifugation, il est possible de régler avec précision l'épaisseur de l'émulsion. Dans le cas du tritium, on sait que le parcours maximum du rayonnement est de l'ordre de $3\text{ }\mu\text{m}$ (ROGERS, 1967). Pratiquement, compte tenu du spectre de désintégration du tritium, l'épaisseur de $2\text{ }\mu\text{m}$ que nous avons choisie satisfait aux conditions quantitatives.

L'avantage principal de notre procédé réside surtout dans sa rapidité. Il est en effet possible de traiter 200 lames par heure, opérations de séchage et stockage comprises. Le procédé classique par pesantier est environ 5 fois moins rapide. En fait, ces rapports sont encore plus bas, car l'utilisateur de ces dernières méthodes encombre rapidement le plateau de travail de la chambre noire par les lames en égouttage ou séchage. Enfin, dans notre méthode, la suite des opérations humides (révélation, fixation) est considérablement accélérée par la présentation des lames, groupées par 24.

C - Analyse radioautographique

1/ La détection du marquage

La méthode d'analyse radioautographique quantitative proposée permet de résoudre simultanément deux problèmes fondamentaux : celui de la précision des mesures et celui de la rapidité opérationnelle. Elle fait appel à une technique récemment appliquée en microscopie et en radioautographie : la microphotométrie sous éclairage incident de la préparation (GULLBERG, 1957 ; ROGERS, 1961). Pour réduire l'importance des phénomènes parasites (lumière

diffusée par le fond coloré, par exemple) DÖRMER (1966, 1967) a proposé l'interposition de filtres spectraux sur le faisceau incident. Ainsi perfectionnée, cette technique devient indispensable dès que la densité des grains dépasse 40 par noyau, mais elle implique cependant une séquence d'opérations longues et complexes comprenant des variations d'éclairage, des ajustements de diaphragmes et des changements d'oculaires de visée. En séparant spectralement les lumières incidente et réfléchiée et en sensibilisant le photomultiplicateur sélectivement à la lumière réfléchiée, les opérations sont considérablement simplifiées. L'observateur ne change jamais le réglage de l'éclairage en cours d'analyse ; il observe en continu la préparation en distinguant à la fois les détails histologiques et les grains d'argent, tandis que le microphotomètre délivre en permanence l'information de marquage de toute cellule située exactement au centre du champ. Une correction simple, appliquée en fonction de la taille de la plage marquée (lue sur le micromètre oculaire), évite les réglages délicats du diaphragme photométrique. Des erreurs peuvent toutefois se produire lorsque les cellules marquées sont très voisines ou pratiquement tangentes ; il est alors difficile d'éliminer l'interaction lumineuse des plages marquées. Cette éventualité est cependant suffisamment rare dans nos préparations pour que les erreurs ainsi introduites soient statistiquement négligeables.

2/ Situation spatiale de l'information radioautographique :

La précision et la rapidité de mesure des radioautographies ainsi obtenues ne sont pas exploitables directement. Le grand nombre de cellules marquées présentes dans une coupe de cerveau de rat implique une analyse méthodique de ces cellules, c'est-à-dire sans omission ni répétition.

La ressemblance des cellules entre elles et leur grand nombre interdisent l'utilisation des critères de forme pour les individualiser. Seule une différenciation à partir des paramètres spatiaux reste possible. On connaît le

manque de précision et la lenteur des procédés classiques en ce domaine : alternance d'objectifs forts et faibles, relevé des coordonnées lues sur les verniers de la platine ou encore systèmes mécaniques (CHAPPELL et OSBORNE, 1968 ; MORTON, 1969). La pose de capteurs de déplacement sur la platine du microscope a permis de disposer en permanence de l'analogue électrique de la position de la platine par rapport à un point fixe tel que l'axe optique de l'objectif. Ces informations de position peuvent être traitées de nombreuses façons. Nous n'avons exploité que le traitement analogique par table traçante ou par écran cathodique. La conversion digitale est néanmoins possible si l'on envisage un traitement différé par ordinateur.

La table traçante a l'avantage de procurer un document photographiable. Parallèlement, un écran cathodique délivre une information analogue sous la forme d'un spot mobile reflétant les déplacements de la platine. L'intérêt de ce dispositif est de permettre un coefficient d'amplification très différent de celui de la table traçante, en plus ou en moins. Il nous a semblé plus efficace de choisir l'amplification de la table de telle sorte qu'elle puisse donner la carte d'ensemble de la coupe, alors que le scope travaillant à fort gain ne donne sur toute sa surface que la représentation d'un seul champ microscopique. Comme les capteurs donnent des informations absolues de position, il est évident que, très rapidement, le spot lumineux sortira de l'écran. L'adjonction d'une mémoire de position permet alors de remettre à zéro le spot pour chaque nouveau champ analysé. Les déplacements du spot reproduiront ainsi exactement les déplacements de la platine créés par l'observateur, qui dispose successivement chaque cellule marquée au centre du champ pour en évaluer photométriquement le marquage. En utilisant un écran rémanent ou, plus simplement, en marquant provisoirement sur l'écran toutes les positions du spot, on obtiendra l'image complète de toutes les cellules mesurées dans le champ.

Le champ d'application d'un tel procédé d'analyse n'est cependant pas limité aux radioautographies. Il peut être étendu d'une façon plus générale à tous les travaux de topographie microscopique comme par exemple la microscopie de fluorescence ou les bilans de dégénérescences expérimentales. Nous signalerons à ce propos que dans une publication postérieure à la nôtre BOIVIE et al. (1969) ont proposé d'utiliser une table traçante nantie de capteurs résistifs.

3/ Représentation graphique :

Les exemples donnés montrent que la transcription graphique s'applique aussi bien à des paramètres qualitatifs (types cellulaires) que quantitatifs (densité en grains). Le changement de la tête traçante suffit pour passer d'un mode de travail à l'autre. Le gain de temps obtenu est difficilement chiffrable, car certains des travaux réalisés ne sont pas concevables par les méthodes classiques. A titre d'exemple, une cartographie X-Y (cellules en position vraie) demande en moyenne 40 heures pour une analyse complète de cerveau de rat. La même cartographie sur axe ne demandera que 15 heures, tandis qu'une carte dressée classiquement à partir des coordonnées relevées pour chacune des cellules marquées exigera 100 heures environ.

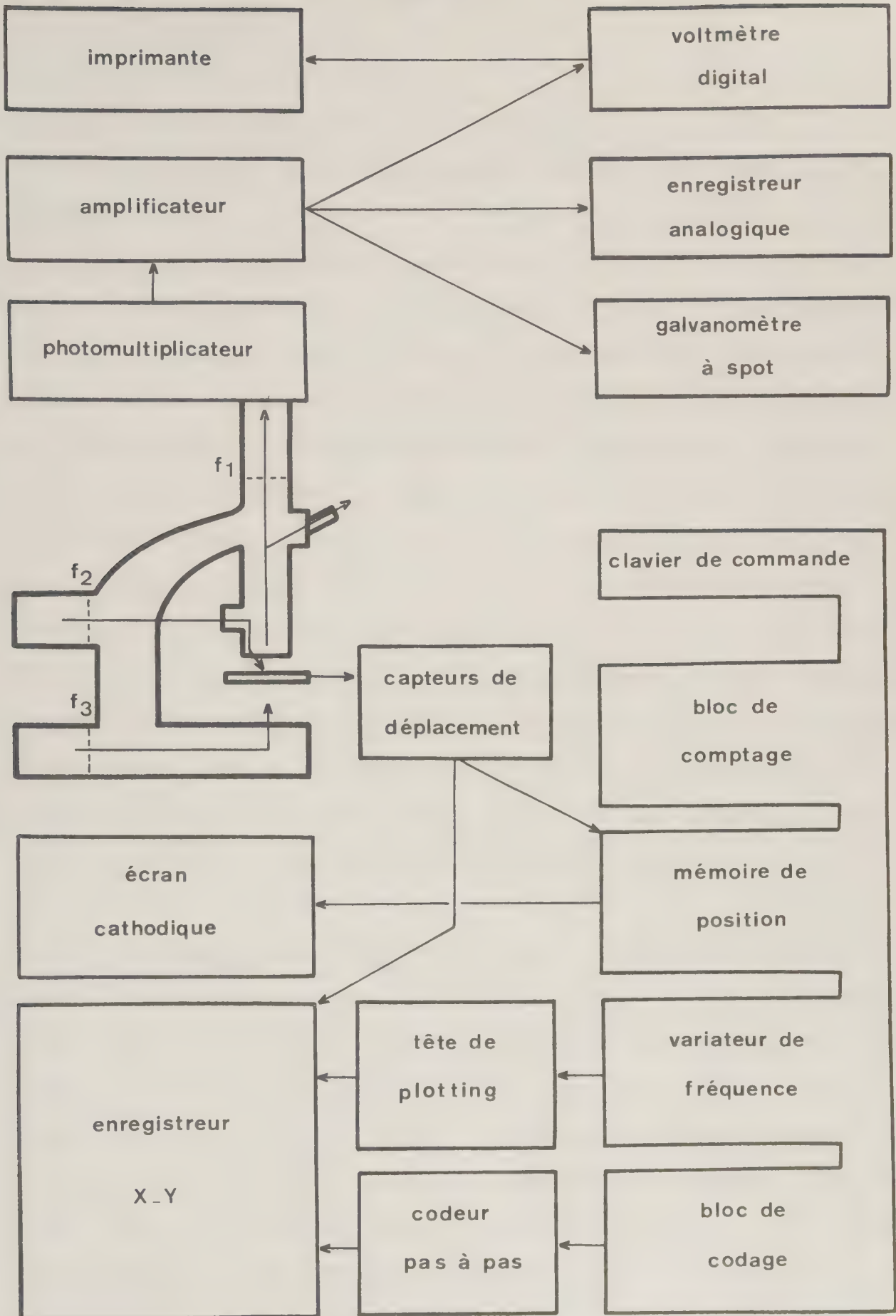
4/ Traitement numérique (Pl. II) :

Le nombre de 8 classes de marquage est très suffisant pour la signification des histogrammes de répartition. Comme on pourra le constater au chapitre concernant les paramètres de marquage cellulaire, en escomptant un marquage maximum de l'ordre de 160 grains par cellule, un espacement de 20 grains pour les 8 classes donne des histogrammes très caractéristiques. Il semble même que 6 classes pourraient suffire. Dans l'ensemble, nos comptages de grains ont donné des maximums autour de 160, mais dans certains cas nous avons observé des marquages de 300 à 400 grains, explicables par des injections multiples et rappro-

PLANCHE I i

SCHEMA SYNOPTIQUE DES FONCTIONS DE L'APPAREILLAGE.

PL 1.1



chées de précurseur. Nous n'avons pas accordé de valeur quantitative à de telles séries, les conditions de validité de mesure photométrique y étant peut-être dépassées.

L'ensemble de comptage constitue ainsi un auxiliaire précieux, qui évite à l'observateur la notation manuelle des résultats au fur et à mesure et lui fournit un certain nombre d'informations complémentaires, telles que le nombre total des grains, à partir desquelles la moyenne des grains (MG) ainsi que le pourcentage ou index de marque (P%) sont très rapidement déductibles. Actuellement, le prélèvement des résultats affichés sur l'ensemble de comptage se fait manuellement. Il serait logique de réaliser un interface de liaison entre l'ensemble de comptage et une perforatrice de cartes pour exploiter rationnellement la grande quantité d'informations acquises. Quant au développement de nos recherches vers un traitement totalement automatique, il reste techniquement possible, mais irréalisable sans des moyens techniques et financiers considérables. En effet, dans la solution automatique, il faut prévoir un scanning commandé par ordinateur, alors que, dans notre solution semi-automatique, les systèmes répétiteurs et mémorisateurs de position répondent en partie à ce problème.

En définitive, des solutions différentes ou complémentaires sont concevables. Ainsi, certains auteurs ont utilisé ou proposé l'analyse par "flying-spot" (DUDLEY et PELC, 1953 ; PRZYBYLSKI, 1970) mais quoiqu'il en soit du principe de base le traitement automatique d'une image aussi complexe qu'une coupe histologique de cerveau et, *a fortiori*, celui d'une radioautographie nécessitera l'emploi d'un ordinateur de très forte puissance. Dans un domaine moins complexe, WIED et al. (1970) ont appliqué cette solution mais malgré la puissance de l'ordinateur employé (IBM 360/30) le champ d'exploration reste restreint et les capacités de reconnaissance limitées à des préparations histologiques particulières (frottis), composées de cellules aux formes simples.

II - CARACTERISTIQUES STRUCTURALES ET RADIOAUTOGRAPHIQUES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL PRENATAL

Les conceptions classiques concernant le fonctionnement des structures embryonnaires du système nerveux central (SNC) ont été profondément bouleversées par l'application des méthodes cytophotométriques et radioautographiques. Depuis les travaux de HIS (1889) on sait que les cellules du SNC dérivent de l'épithélium pseudostratifié primitif. Celui-ci est bordé en direction de l'axe de la gouttière (et du tube ultérieurement) par une membrane limitante interne et en direction du tissu mésodermique par une limitante externe. Dans cet épithélium HIS distinguait 2 types cellulaires, les cellules épithéliales proprement dites et les cellules germinales (localisées contre la limitante interne) et il pensait que seules ces dernières étaient aptes à produire des neuroblastes. Ce schéma fut modifié par SCHAPER (1897) et CAJAL (1909) qui observèrent que les cellules germinales n'étaient pas des éléments spécialisés bien au contraire, puisqu'elles étaient à l'origine des cellules épithéliales, des neuroblastes, et des cellules germinales. Il fallut attendre SAUER (1935) et surtout la méthode radioautographique (SIDMAN et al., 1959 ; FUJITA, 1963 ; STENSAAS et STENSAAS, 1968) pour qu'il soit démontré que la cellule germinale n'était en fait que la forme mitotique de la cellule épithéliale de HIS ou de CAJAL. La localisation systématique des mitoses près du ventricule s'explique par une cinétique très particulière suivie par les cellules épithéliales. Celles-ci décrivent un mouvement alternatif entre les membranes limitantes externes et internes dont la correspondance avec le cycle génératif (HOWARD et PELC, 1951) commun à toutes les cellules en prolifération est établie (FUJITA, 1963 ; ATLAS et BOND, 1965 ;

BISCONTE, 1967). Après division, les cellules filles quittent la limitante interne et, selon le stade évolutif, restent dans le neuroépithélium pour participer à son épaissement ou, lorsque la maturité est atteinte, sont émises à l'extérieur du neuroépithélium où elles s'accumulent pour former le manteau. La terminologie employée pour désigner les subdivisions fondamentales de ces structures embryonnaires est particulièrement complexe. En 1970, LE BOULDER COMMITTEE a proposé une nomenclature simplifiée, fondée sur des critères topographiques et permettant de distinguer quatre zones fondamentales (Pl. II A, Pl. II B) :

- la zone ventriculaire (cellules germinales et spongioblastes de HIS, neuroépithélium, matrice de FUJITA, couche mère de LAHOUSSE) ;
- la zone marginale (voile marginal de HIS) ;
- la zone intermédiaire (manteau et couche intermédiaire de HIS) ;
- la couche subventriculaire, qui est le précurseur de la couche subépendymaire trouvée chez l'animal postnatal.

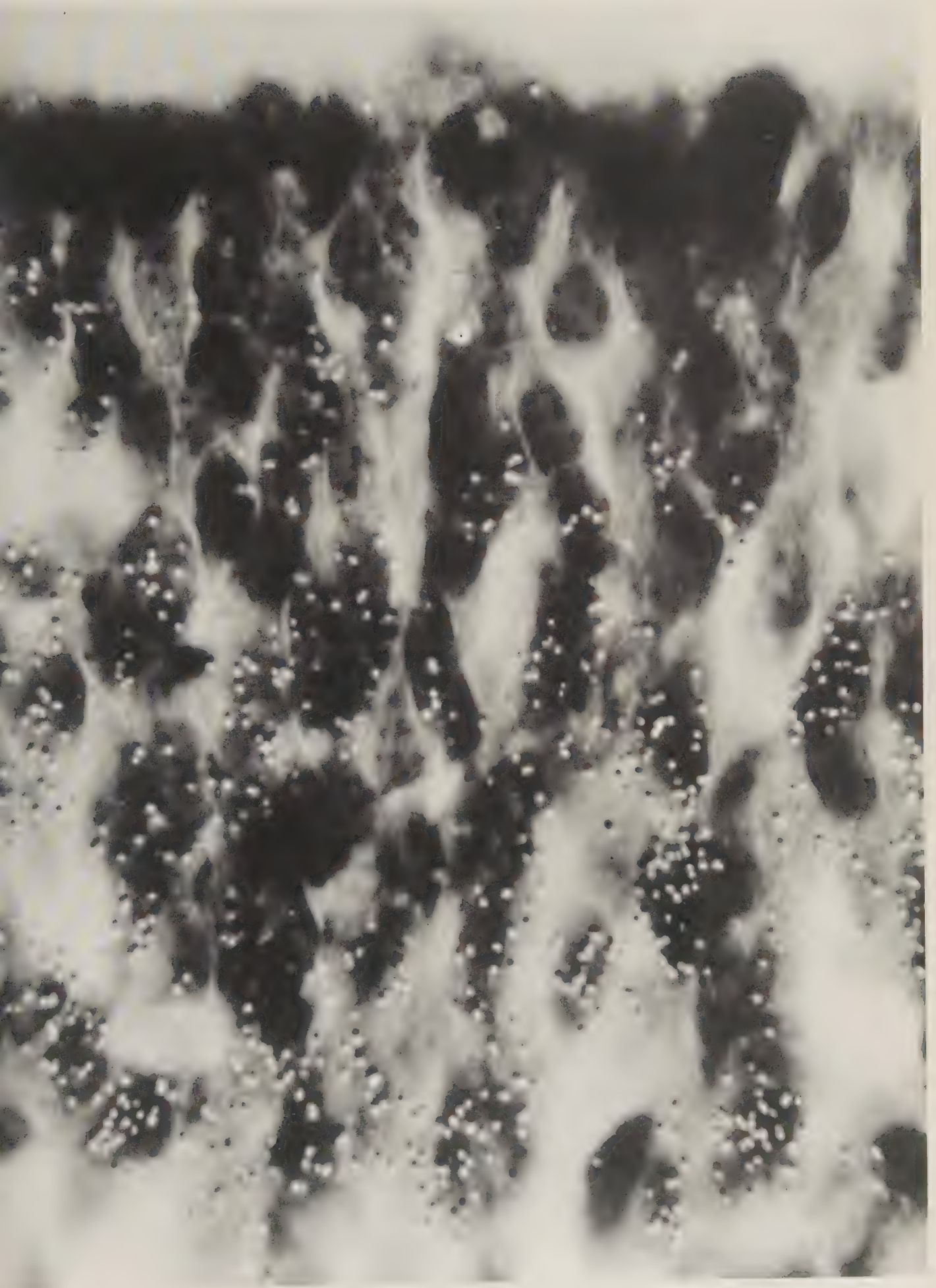
Cette dernière couche est à l'origine de névroglie, mais également de certains neurones et son existence complique la conception initiale d'une formation émissive unique pour l'ensemble du SNC. Quoi qu'il en soit, même si les neurones dérivent de deux structures distinctes, les caractéristiques de leur marquage radioautographique ne dépendront que de leurs paramètres cinétiques (cf. chapitre III). Le paramètre fondamental en la matière est le cycle génératif, qui définit les stades de la vie cellulaire par rapport à l'activité de synthèse de l'ADN dans le noyau (HOWARD et PELC, 1951, 1953). Or, la durée de ce cycle varie d'un tissu à l'autre et pour un même tissu elle évolue au cours du temps. Enfin, elle n'est pas toujours identique à un moment déterminé pour toutes les cellules d'un tissu. Les patterns de marquage neuroniques observés à l'âge adulte dépendront donc de l'importance des facteurs de variabilité et d'homogénéité au cours de l'embryogenèse.

PLANCHE II A

ZONE VENTRICULAIRE TELENCEPHALIQUE D'UN FOETUS DE 14 JOURS.

- La thymidine tritiée a été administrée par voie intra-amniotique et le sacrifice est intervenu 30 minutes après. Emulsion ILFORD K2 - éclairage mixte (incident + transmis). La photographie a été prise selon un procédé particulier qui vise à restituer une impression de relief.

- Le marquage est localisé à la zone profonde de la zone V (zone s de FUJITA). A l'opposé, dans la zone superficielle on notera l'absence de marquage sur les cellules en mitose (zone m de FUJITA).



RESULTATS

A - Cycle évolutif des zones ventriculaires

L'analyse spatio-temporelle des zones ventriculaires (zones V) dans le tube neural montre qu'elles présentent une grande unité structurale. Elles ont un cycle évolutif comparable, dont la chronologie est organisée schématiquement dans le sens caudo-rostral. La zone intermédiaire (zone I) voit son développement directement lié à la production cellulaire de la zone V. Aussi, le rapport des épaisseurs entre V et I est-il très significatif du degré d'évolution de la zone V. On peut également remarquer que la densité cellulaire semble varier dans la partie profonde de cette dernière zone, les structures jeunes étant les plus denses. Sur les radioautographies, on peut observer que la zone des cellules marquées correspond à une bande bien définie (zone s de FUJITA, 1962) de la zone V, à condition que les délais de sacrifice soient courts (Pl. II A et II B).

En ce qui concerne le marquage lui-même, on peut définir une moyenne des grains (MG) pour les cellules marquées et un indice photométrique qui mesurera la densité des grains dans la zone de marquage. Le tableau 4 résume l'analyse de 25 zones ventriculaires et des zones intermédiaires qui leur sont associées. Le classement a été fait topographiquement, des zones les plus jeunes aux zones les plus âgées, par ordre croissant puis décroissant d'épaisseur.

1/ Evolution de l'épaisseur de la zone V

L'épaisseur évolue entre 20 et 240 μm , quel que soit le niveau considéré, l'épaisseur maximale étant atteinte à des stades différents suivant les vésicules du tube neural.

2/ Evolution de l'épaisseur de la zone I

Les dimensions maximales sont variables suivant les vésicules, le maximum observé pouvant dépasser 1200 μm dans le diencéphale.

3/ Evolution de l'épaisseur de la zone marquée (zone s)

Elle est dans l'ensemble proportionnelle à l'épaisseur de la zone V et varie du quart à la moitié, sauf dans les zones minces où ses limites sont difficilement évaluables (Pl. II A).

4/ Densité cellulaire de la zone des mitoses de la zone V (zone m de FUJITA)

Elle a été évaluée par microphotométrie d'absorption après coloration par le crésyl violet. Les résultats montrent que sa constance est remarquable, la valeur moyenne étant de 30 unités photométriques arbitraires.

5/ Densité de la zone s

Elle a été appréciée par la même méthode. Sa valeur décroît régulièrement de l'échantillon 1 à l'échantillon 25 (62 à 29 unités photométriques).

6/ Indice photométrique de marquage de la zone s

Ce paramètre exprime les valeurs photométriques de la densité des grains de marquage par unité de surface. Il est en partie lié à l'index de marquage (P%), mais ne doit pas lui être assimilé, en particulier parce qu'il dépend également de la moyenne des grains (MG). Le tableau 4 montre que cet indice ne dépasse pas 52. Cette valeur arbitraire étant obtenue après un étalonnage du photomètre dans lequel l'indice 100 correspondrait au marquage de toutes les cellules, ce fait signifie que dans le meilleur des cas environ 50 % des cellules de la zone s peuvent être marquées. Ce maximum s'observe dans les zones V en pleine maturité caractérisées par un rapport I/V proche de l'unité et des épaisseurs (I et

V) de l'ordre de 100 μm . De part et d'autre de ce maximum l'indice photométrique décroît mais une activité proliférative subsistera tardivement même dans les zones V peu épaisses parvenues au terme de leur évolution.

n° échantillon	épaisseur zone V	épaisseur zone I	épaisseur zone s	densité zone m	densité zone s	indice photom. zone s	niveau du tube neural	stade (jours)
1	24	22	-	34	62	-	Télenc.	12
2	23	72	-	31	59	6,7	Dienc.	11,5
3	40	90	-	31	61	4,1	Dienc.	12,5
4	70	180	32	30	53	16,1	Dienc.	12,5
5	85	80	30	29	56	23,5	Mésenc.	13,2
6	90	170	41	33	62	18,9	Télenc.	14
7	100	70	38	32	52	32,6	Dienc.	13
8	125	125	37	28	50	46,5	Dienc.	12,5
9	130	20	38	29	51	31,7	Mésenc.	13
10	135	80	42	30	47	51,9	Mésenc.	12,5
11	140	75	44	30	42	12,8	Dienc.	11,5
12	140	130	49	28	40	48,2	Dienc.	13
13	150	200	48	31	40	49,6	Télenc.	14,5
14	160	175	47	30	43	50,6	Télenc.	14,5
15	180	190	52	30	37	36,2	Dienc.	13,5
16	220	200	75	30	30	51,2	Télenc.	15
17	180	320	100	31	28	29,3	Dienc.	14,2
18	155	345	60	30	32	46,4	Télenc.	15,5
19	140	220	50	30	29	42,8	Télenc.	15,5
20	135	510	42	32	22	16,7	Télenc.	17,5
21	100	420	34	31	20	13,5	Dienc.	14,5
22	85	900	23	30	24	6,9	Télenc.	16,5
23	80	320	27	30	27	9,1	Dienc.	12,5
24	70	600	35	25	20	-	Dienc.	14
25	40	310	-	24	29	-	Mésenc.	14,5

Tableau 4 - Evolution des zones V et I.

Les échantillons sont classés par ordre croissant de maturité. Les épaisseurs sont en μm et les densités en unités photométriques arbitraires. Les zones s (zones de synthèse de l'ADN) et m (zones des mitoses) correspondent aux divisions fonctionnelles de la zone V d'après FUJITA (1962).

PLANCHE II B

ANALYSES PHOTOMETRIQUES DU TUBE NEURAL.

Fig. 1 & 4 : enregistrements radioautographiques photométriques en lumière incidente obtenus par scanning répété radialement sur un télencéphale embryonnaire. Stade 13,5 j ; délai de sacrifice : 5 heures. Le marquage est localisé aux régions centrales et externes de la zone ventriculaire (V).

Fig. 2 & 5 : enregistrements photométriques superposés (fig. 2) de la densité cellulaire (mêmes zones que précédemment). Mise en évidence des 3 zones V, I et M.

Fig. 3 & 6 : schéma de la structure histologique (inspiré de RAKIC, BOULDER COMMITTEE, 1970).

fig. 1



fig. 2

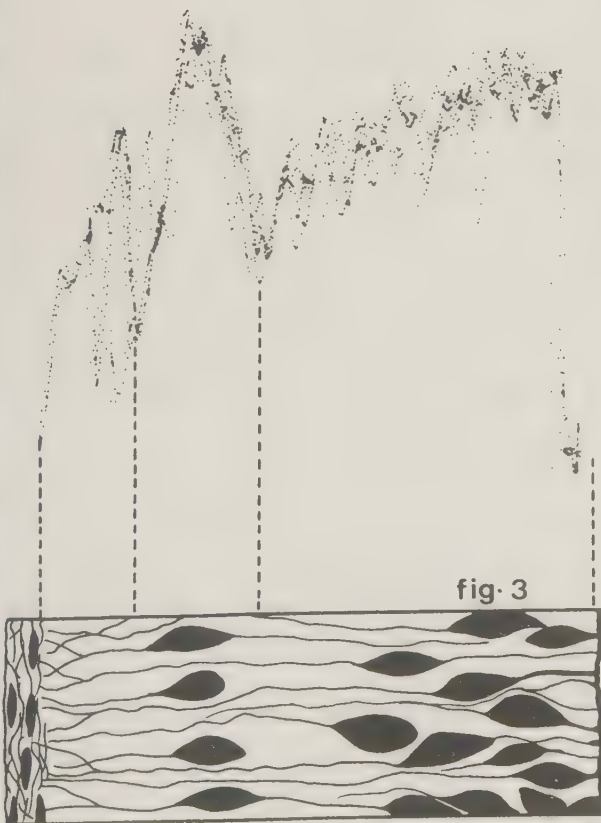


fig. 3

M I V

fig. 4



fig. 5

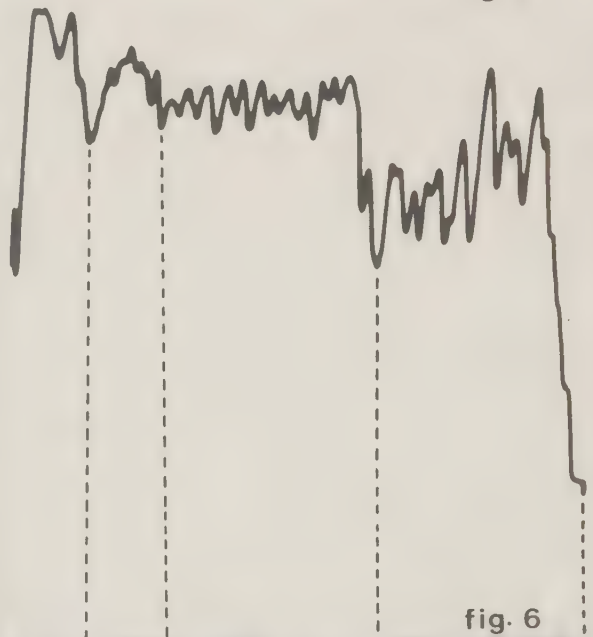
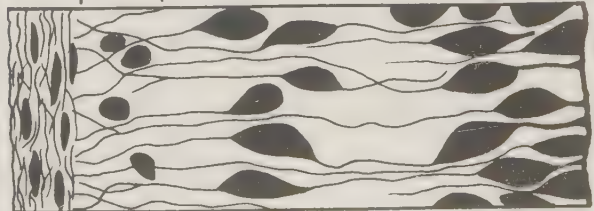


fig. 6



M I V

B - Paramètres du marquage radioautographique prénatal

Pour tous les stades et à tous les niveaux étudiés, la zone de marquage de la région ventriculaire correspond à la zone s de FUJITA à condition que les délais de sacrifice soient brefs (Pl. II A). Cette subdivision fonctionnelle (zone de synthèse de l'ADN) est peu apparente dans les zones ventriculaires minces correspondant à des stades précoces ou, à l'opposé, à des stades de régression. Le comptage du marquage montre que les valeurs trouvées pour chacune des cellules marquées sont peu différentes entre elles. Si le comptage est pratiqué dans une zone ventriculaire dont le marquage a été effectué 5 heures avant le sacrifice, on constate que l'histogramme de répartition est de type "poissonnien" avec $\frac{S^2}{m} = 2$ (Pl. II C, fig. 3) c'est-à-dire proche du rapport $\frac{S^2}{m} = 1$ caractéristique de la distribution de Poisson (S^2 = variance, m = moyenne). Si l'on sépare les mesures selon les régions profonde (zone s) et superficielle (zone m), on obtient deux histogrammes en excellente coïncidence avec la loi de Poisson, soit $\frac{S^2}{m} = 0,9$ pour la zone superficielle (Pl. II C, fig. 1) et $\frac{S^2}{m} = 1,25$ pour la zone profonde (Pl. II C, fig. 2).

En étudiant la moyenne m qui correspond à celle des grains (MG), on constate qu'elle est plus basse dans la zone superficielle, ce qui s'explique par la présence d'un certain nombre de cellules déjà divisées. Pour obtenir les résultats les plus précis possibles, le comptage a été visuel et les conditions de pose choisies pour que le nombre des grains ne dépasse pas 30 par cellule. Dans ces conditions, la moyenne m est faible et, comme le prévoit la loi de Poisson pour de telles valeurs de m ($m < 15$), la répartition est dissymétrique (Pl. II C, fig. 3) avec étalement vers la droite.

Si le marquage est plus fort, il n'est plus possible d'utiliser le comptage visuel et le comptage automatique lui est substitué. On constate alors que les histogrammes s'écartent un peu de la distribution de Poisson ($\frac{S^2}{m}$ compris

PLANCHE II C

HISTOGRAMMES DE REPARTITION DES CELLULES MARQUEES.

Fig. 1,2,3 : Histogrammes de répartition du marquage cellulaire après comptage visuel ; zone ventriculaire (V) diencéphalique embryonnaire de 13,5 jours marquée 5 heures avant le sacrifice par une injection flash de 10 μ Ci chez l'embryon.

n = nombre de cellules comptées

m = moyenne

$\frac{s^2}{m}$ = rapport de la variance sur la moyenne ; proche de 1, il caractérise la distribution de Poisson.

En abscisses le nombre de grains par cellule, en ordonnées le nombre de cellules.

Fig. 1 : région superficielle de la zone V (zone m)

Fig. 2 : région profonde de la zone V (zone s)

Fig. 3 : zone V totale.

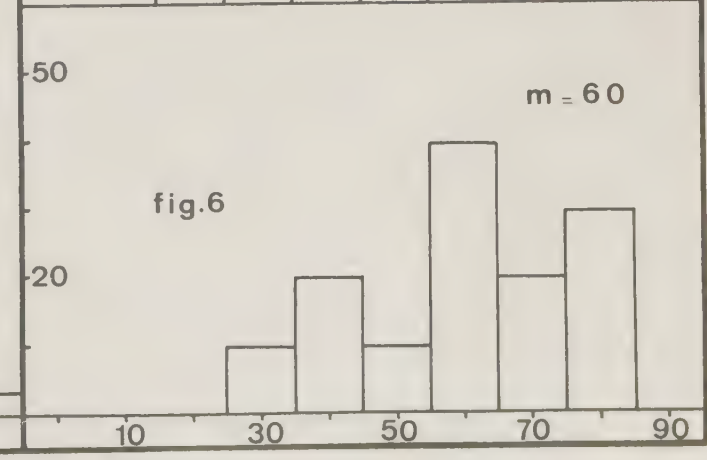
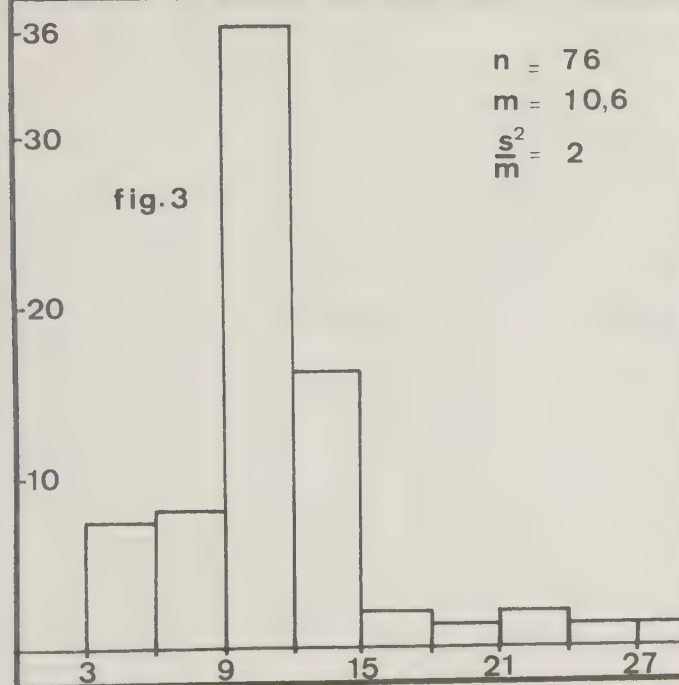
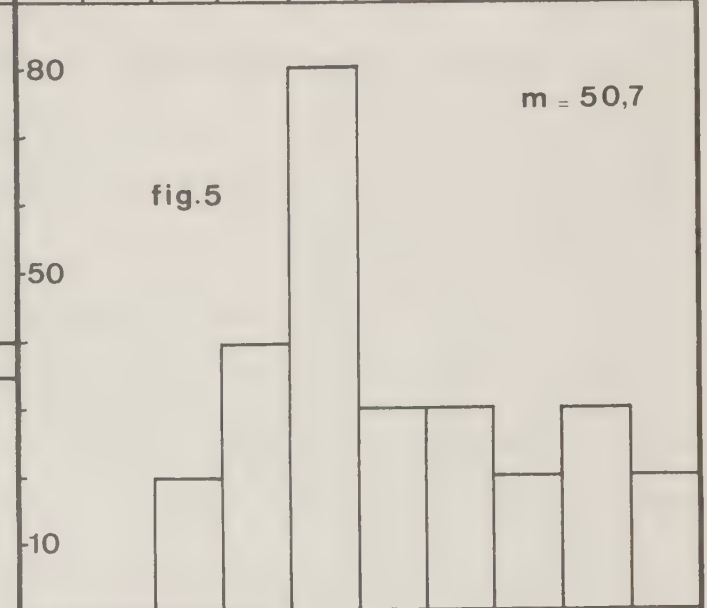
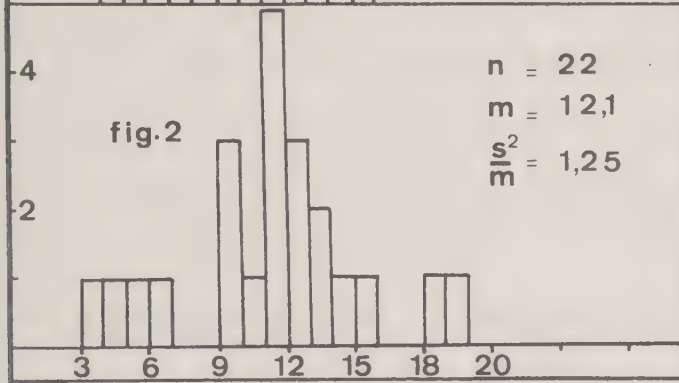
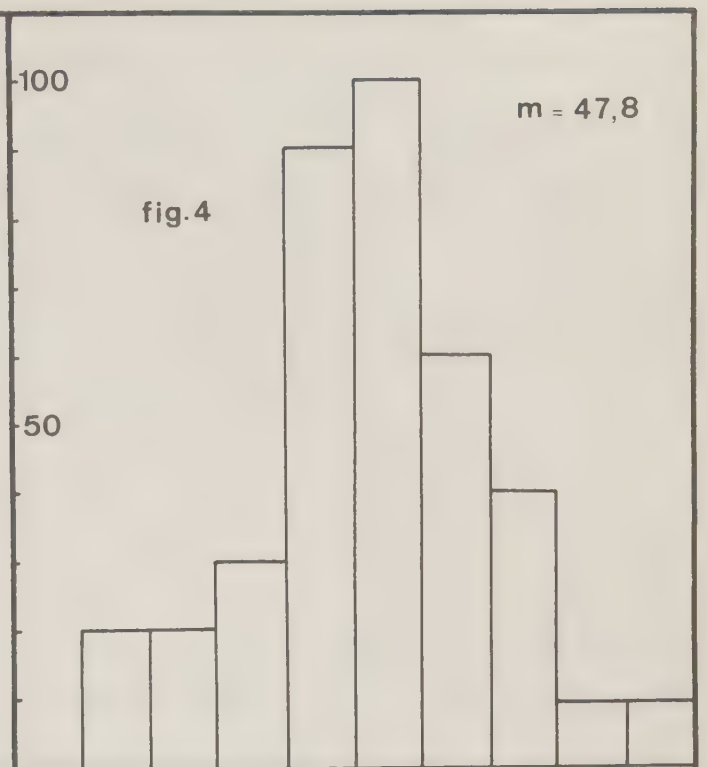
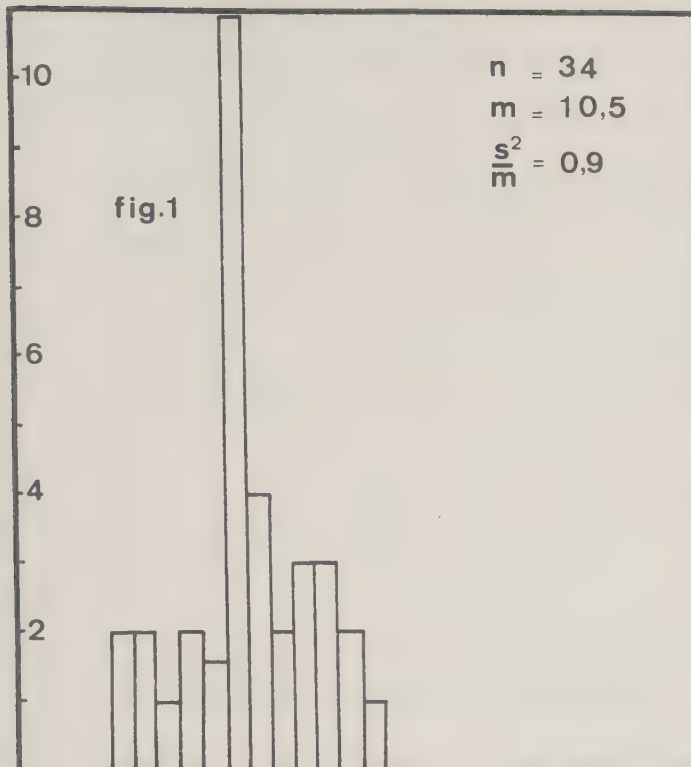
Fig. 4,5,6 : Histogrammes de répartition du marquage cellulaire après comptage photométrique. Stade 15 jours, mêmes conditions que précédemment. Comparaisons des moyennes de grains.

Fig. 4 : zone V télencéphalique

Fig. 5 : zone V diencéphalique

Fig. 6 : zone V diencéphalique en régression.

PL II.C



entre 3 et 7 suivant les cas). Si l'on considère les moyennes, on note que les valeurs sont proches dans les zones ventriculaires situées à des stades d'évolution comparables, telles que par exemple, vers 15 jours, les zones V télencéphaliques et certaines portions des zones V du diencéphale (Pl. II C, fig. 4 et 5). Par contre, il existe une différence sensible entre ces mêmes zones et une zone V en régression dans le diencéphale (Pl. II C, fig. 6).

C - Cycles génératifs

La méthode de choix pour déterminer les cycles génératifs est la méthode des mitoses marquées (QUASTLER et SHERMAN, 1959). Elle s'applique bien au tube neural, les mitoses y étant particulièrement localisées. Cependant la méthode de photométrie que nous avons développée en permet une nouvelle approche. L'existence de mouvements cellulaires de va-et-vient régulier dans la zone ventriculaire permet d'en visualiser les différences phases. Pratiquement, nous avons limité son application à la vérification de la longueur du cycle (TC) en procédant de la façon suivante. Le sacrifice de l'embryon a lieu 30 minutes après l'injection de thymidine tritiée. Après radioautographie, on trace par scanning photométrique la courbe de densité cellulaire de la zone choisie (en absorption) puis, sans changer l'axe de scanning, on trace la courbe photométrique de densité en grains d'argent (en réflexion). On pratique ensuite la même double opération sur un axe de scanning voisin et ainsi de suite jusqu'à ce que la superposition de 4 à 10 balayages donne une image statistique des densités. Au départ, la bande marquée ainsi analysée présente une structure transversale qui fait penser à une loi de répartition normale ; mais, au fur et à mesure du déplacement de la vague marquée vers le ventricule, la courbe se déforme et un pic de densité se dessine près de la surface (Pl. II B, fig. 1). Plus tardivement et après mitoses, la vague marquée s'éloigne du ventricule et, présente de nouveau la répar-

tition du départ, mais selon une courbe plus étalée. En procédant par sacrifices échelonnés, on obtient ainsi une bonne visualisation des déplacements de la vague marquée. Cependant, pour décomposer le cycle génératif en ses différentes phases, la méthode des mitoses marquées demeure préférable. En 1967, nous avons pu obtenir les premiers résultats sur le tube neural de Rat examiné au début de son développement (BISCONTE, 1967). Avec DEMEMES (1969), nous avons étendu ces mesures à différents niveaux du SNC embryonnaire et démontré que le cycle génératif s'allonge au cours de l'ontogenèse. Initialement (11^e jour de gestation), le cycle génératif moyen déterminé par comptage à plusieurs niveaux (BISCONTE, 1967), est d'environ 8 heures pour une phase de synthèse de 5,6 heures. Il s'allonge ensuite progressivement pour atteindre 12,3 heures vers 16 jours, tandis que la durée de la phase de synthèse reste sensiblement constante et comprise entre 5 et 6 heures. La méthode photométrique confirme la plupart de ces mesures de longueur de cycle, sauf pour les stades de 15 et 16 jours où les valeurs précédemment obtenues semblent trop faibles d'une ou deux heures.

A un stade déterminé la comparaison entre les différents niveaux du tube neural ne permet pas de déceler de différence dans la durée du cycle si le stade choisi est précoce. Au-delà du 13^e jour des différences pouvant aller jusqu'à 25 % sont observables.

D - Autres zones prolifératives

En dehors des zones ventriculaires qui supportent l'essentiel de l'activité proliférative du tube neural, on distingue plus tardivement deux autres niveaux d'activité.

1/ Zones subventriculaires (zones S)

Certaines zones présentent des mitoses situées, non plus au voisinage de la surface ventriculaire, mais disséminées dans la masse cellulaire.

Ce cas est très apparent vers 14 jours dans la région de l'éminence ganglionnaire. On trouve des images comparables dans la région de la lèvre rhombique. On peut remarquer que, dans ces zones, la moyenne des grains est proche de celle des zones ventriculaires télencéphaliques ou diencéphaliques (11,2 pour S, 12,1 pour V). Par contre, l'index de marquage est très différent (26,2 % pour S, 48 % pour V).

2/ Zones intermédiaires (zones I)

On trouve parfois précocement (13-14 j) des cellules marquées dans les zones intermédiaires, régions qu'il est parfois difficile de séparer avec netteté des zones subventriculaires. Mais, alors que la moyenne des grains y reste comparable à celle des autres zones (13,2 pour la zone I mésencéphalique) l'index de marquage est toujours très bas et oscille entre 0 et 2 % lors des stades inférieurs à 15 jours. Fait à noter, ces cellules marquées sont souvent proches de capillaires. Il faut attendre des stades plus tardifs pour que ce pourcentage augmente nettement (16-18 j).

DISCUSSION

A - Cycle évolutif des zones ventriculaires en prolifération

Quel que soit le niveau du SNC embryonnaire, les zones ventriculaires montrent une grande unité évolutive. Cependant, des décalages chronologiques importants existent dans l'état de développement des différents niveaux. La chronologie d'apparition de renflements, d'invaginations et des sillons qui en découlent permet d'établir une première systématisation sur ces simples bases macroscopiques (HIS, 1893 ; KINGSBURY, 1932 ; BERQUIST, 1932, 1952). Les critères radioautographiques, comme l'index de marquage des zones prolifératives, en augmentent la précision (BISCONTE et MARTY, 1967). Les observations que nous avons pu faire sur l'adulte et qui seront abordées ultérieurement sont en parfaite concordance avec cette chronologie prénatale ; aussi n'en a-t-il pas été fait l'exposé dans ce chapitre.

1/ Caractéristiques structurales :

L'homogénéité histologique des zones ventriculaires a été remarquée très précocement (HIS, 1889 ; CAJAL, 1909) et confirmée par la suite en microscopie électronique (FUJITA et FUJITA, 1963). En considérant les dimensions de zones V mesurées dans 3 vésicules (Télencéphale, Diencéphale, Mésencéphale), on constate que leur épaisseur évolue de 20 μm pour les plus jeunes jusqu'à 240 μm dans des zones en pleine maturité, puis régresse pour ne former finalement qu'une couche de 10 à 20 μm . En ce qui concerne la densité cellulaire, elle reste constante dans la région juxtaventriculaire, ce qui peut s'expliquer par la présence de cellules en mitoses dont les caractéristiques de colorabilité et de dimensions (rapport nucléo-plasmique) sont stables. Par contre en profondeur, la densité cellulaire décroît très régulièrement au fur et à mesure du vieillissement de la zone ventriculaire. Il peut y avoir plusieurs explications à cette

observation, car le changement de densité photométrique peut certes dépendre de la colorabilité du cytoplasme et du rapport nucléoplasmique, mais aussi d'une dispersion cellulaire. Cette dernière pourrait s'expliquer par l'accumulation des expansions cytoplasmiques des neuroblastes produits. Bien que ceux-ci soient rejetés dans la zone intermédiaire, leurs expansions (cytoplasmiques) restent en effet fixées à la paroi ventriculaire (FUJITA, 1963).

2/ Relations anatomo-fonctionnelles :

L'épaisseur de la zone marquée se révèle sensiblement proportionnelle à l'épaisseur de la zone V, mais la mesure en est difficile pour les zones trop jeunes ou trop âgées en raison du faible nombre de cellules marquées qu'elles contiennent, car la longueur du cycle génératif varie d'un stade à l'autre. Nous avons ensuite comparé les indices photométriques de marquage pour des stades prénataux très éloignés et observé des différences spectaculaires, qui ne peuvent s'expliquer par des variations de longueur de cycle (voir justification théorique chapitre suivant). On constate que l'indice atteint au maximum 50 %, ce qui pourrait s'expliquer par la proportion d'environ 1/2 qui a été trouvée ultérieurement entre le temps de synthèse (TS = entre 5 et 6 heures) et la durée du cycle (TC = entre 10 et 13 heures). Ce fait confirme que les divisions cellulaires du compartiment prolifératif sont bien de type asynchrone. Comme précédemment, on pourrait invoquer la minceur des zones ventriculaires aux stades extrêmes de leur évolution pour expliquer les faibles valeurs d'indice trouvées ; cependant, des indices aussi bas sont trouvés dans des zones relativement épaisses lorsque le rapport d'épaisseur I/V dépasse l'optimum (environ 1).

En conclusion, il est probable que, dans les zones V en régression -c'est-à-dire ayant dépassé le rapport I/V optimum-, un certain nombre de cellules perdent leur capacité mitotique tout en demeurant dans la profondeur de la zone V. Leur apport contribuerait à faire baisser l'index de marquage et l'in-

dice photométrique.

B - Marquage ventriculaire initial

En respectant les conditions nécessaires aux mesures radioautographiques quantitatives, nous avons pu étudier des histogrammes de distribution des comptages cellulaires dans les zones ventriculaires. La théorie prévoit que, dans le meilleur des cas, lorsque les doses de précurseur absorbées sont identiques pour toutes les cellules marquées, la distribution correspond à la loi de Poisson, dans laquelle $\frac{S^2}{m} = 1$ (rapport de la variance à la moyenne) (CARO, 1961 ; CARO et FORRO, 1961 ; VAN TUBERGEN et SETLOW, 1961 ; ASBOE et al., 1965). Nos résultats démontrent que l'on obtient de tels histogrammes pratiquement pour n'importe quelle zone ventriculaire, à condition de pratiquer le comptage visuel (ce qui implique des densités de grains faibles) et de ne pas utiliser des délais injection-sacrifice trop longs. Les rares mesures effectuées sur des cellules de Mammifères montrent souvent des distributions beaucoup plus étalées avec $\frac{S^2}{m}$ supérieur à 5 (CLEAVER, 1967), mais parfois proche de 1 (KOBURG, 1963). Nous avons constaté qu'en pratiquant le comptage automatique sur des radioautogrammes plus marqués (temps de pose supérieur), le rapport $\frac{S^2}{m}$ augmentait considérablement. Il est probable que le procédé photométrique est à l'origine d'une légère dispersion des résultats (ENGLAND et al., 1970) mais d'autres raisons peuvent être invoquées. KOBURG (1963) a signalé que lorsque le temps de pose augmente de 3 à 8 jours $\frac{S^2}{m}$ passe de 2,5 à 6,8 pour des cellules intestinales de Souris marquées par la thymidine ^3H . L'explication du phénomène est inconnue. D'autres facteurs peuvent intervenir dans l'élargissement de l'histogramme : variations d'épaisseur (ROGERS, 1967) ou de sensibilité de l'émulsion (FORRO, 1957) et facteur de coïncidence qui explique qu'un rayon β puisse suivant son énergie ou sa trajectoire donner naissance à un ou plusieurs grains d'argent

(DORMER et BRINKMANN, 1968 ; ENGLAND et al., 1970). Indépendamment de ces facteurs techniques il reste une explication biologique. Quelques auteurs trouvent des répartitions qui sont éloignées de la distribution théorique (FORRO, 1957 ; CHERNICK et EVANS, 1968). Des mesures photométriques de l'ADN (Feulgen) indiqueraient dans ces cas que le taux de synthèse de l'ADN est variable d'une cellule à l'autre ou même pour une cellule. Cependant il faut probablement faire la différence entre le taux de synthèse de l'ADN et le taux d'incorporation de thymidine qui reflèterait plutôt un taux d'accroissement du pool intracellulaire des précurseurs de l'ADN (COHN, 1968). Ce taux d'incorporation pourrait varier ou non, indépendamment du taux de synthèse de l'ADN. Une autre cause d'étalement de l'histogramme pourrait être liée aux cellules polyploïdiques dont l'existence a été démontrée parmi les grands neurones pyramidaux du Chat (HERMAN et LAPHAM, 1969). Le phénomène est quantitativement réduit et il doit probablement être circonscrit spatialement et temporellement à quelques zones ventriculaires. Les variations de géométrie du noyau peuvent également intervenir comme facteur d'élargissement de l'histogramme (SIMNETT, 1968). Ceci s'observe sur l'histogramme de la zone V superficielle (Pl. II C, fig. 1) qui comprend une population marquée hétérogène quant au diamètre nucléaire (cellules en mitose ou non).

C - Cycle génératif

La méthode classique des mitoses marquées (QUASTLER et SHERMAN, 1959) a été appliquée au tube neural de Poulet (FUJITA, 1962), de Souris (ATLAS et BOND, 1965 ; KAUFFMAN, 1966), de Rat (BISCONTE, 1967 ; DEMEMES, 1969). Cette structure répond, comme nous venons de le voir, aux critères d'emploi de la méthode (DREW et PAINTER, 1962 ; TAKAHASHI, 1966), c'est-à-dire population cellulaire homogène et en division asynchrone, cycle constant ou peu variable. Cependant ce procédé manque inévitablement de précision et, d'autre part, il n'existe pas de test statistique pour le valider (MARES et al., 1970). La méthode photo-

métrique que nous avons employée complémentirement s'applique à la détermination de la longueur du cycle, mais ne donne pas d'information sur les différentes phases qui le composent. Les valeurs que nous avons obtenues en fonction de l'âge prénatal montrent des variations de 8 à 15 heures pour TC (entre le 11^e jour et le 16^e jour). Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu chez la Souris par KAUFFMAN (1968), qui a mesuré un allongement de TC de 8,5 à 10,5 heures entre le 10^e et le 11^e jour. Certains auteurs ont attiré l'attention sur l'existence de variations de la longueur du cycle génératif en fonction du rythme nycthéméral (LOBBECKE et SCHULTZE, 1969) ou de la température tissulaire (LULLINI-GALLIANI et PAGANI, 1966 ; CHIBON, 1969) ; mais dans nos expériences les variations horaires d'injection étaient suffisamment faibles pour pouvoir éliminer cette cause d'erreur. Toutes les phases du cycle subissent un allongement d'importance inégale (DEMEMES, 1969). Des phases G_1 , G_2 , M et S, seule la dernière (avec TC) est importante quant aux caractéristiques du marquage (voir chapitre suivant). Cette phase S dure environ 5 heures et semble assez stable, compte tenu de la précision que l'on peut escompter des mesures. Les résultats obtenus par d'autres auteurs chez la Souris et le Poulet sont très comparables aux nôtres (ATLAS et BOND, 1965 ; LANGMAN, 1966 ; MARTIN, 1967 ; KAUFFMAN, 1968, ; 1969) et oscillent entre 4,5 heures et 6 heures.

Il y a très peu de références dans la littérature consacrées à la variabilité du cycle génératif considéré à un moment donné, pour différents niveaux du tube neural. WATTERSON (1965) pense qu'il existe une différence entre les cycles génératifs de la plaque alaire et de la plaque basale. Nos résultats montrent que les cycles génératifs sont peu différents sur l'ensemble du tube neural au cours des premiers stades. Par contre, dans les stades plus avancés, on observe des variations importantes du pourcentage de mitoses marquées, qui ne peuvent s'expliquer que par des allongements du cycle. Quant aux variations

importantes de l'index de marquage, elles s'expliqueraient plutôt par une perte des capacités mitotiques affectant certaines cellules.

D - Autres zones prolifératives

Si la moyenne des grains est identique dans les zones subventriculaires (S) et les zones ventriculaires (V) il n'en est pas de même pour l'index de marquage qui est généralement plus faible de moitié dans les zones S. Ceci est probablement dû à l'interpénétration des compartiments prolifératif et non prolifératif dans les zones S, où les glioblastes et neuroblastes produits interviennent dans le dénominateur de l'index, alors que ce n'est pas le cas pour les zones V. Le cas des zones intermédiaires (I) est particulièrement difficile à interpréter, on y trouve très précocement quelques cellules marquées isolées dont la constante dispersion ne permet pas de connaître avec certitude leur origine ; il s'agit probablement de cellules de source ventriculaire. Peu avant la naissance enfin, on observe une augmentation du nombre de cellules isolées marquées, mais rien ne permet de dire s'il s'agit du résultat prolifératif des premières cellules trouvées dans les zones I ou de l'apport de contingents cellulaires spéciaux émis par les zones subventriculaires.

E - Conclusions

La confrontation de l'ensemble de ces résultats montre que les zones émissives principales (zones V) suivent une évolution structurale et fonctionnelle très comparable. Le passage aux différentes étapes évolutives se fait hétérochroniquement selon un gradient schématiquement caudo-rostral. L'origine de ce décalage tient probablement à des différences dans les paramètres du cycle génératif et plus précisément à des variations dans la durée de celui-ci. Le calcul montre que 30 % d'écart sur un cycle de 8 heures conduit à des diffé-

rences de production cellulaire totale dans le rapport 6 au bout de 48 heures. En fait les contrastes ne sont jamais aussi accentués et ils ne se manifestent qu'au terme de 3 jours de fonctionnement, aussi des différences bien plus faibles de la longueur du cycle suffisent-elles à les expliquer. Si la méthode des mitoses marquées ne permet pas de révéler de telles variations faibles et localisées en revanche elle démontre l'allongement généralisé du cycle génératif moyen au cours de l'ontogenèse. L'incidence de ce fait se manifestera surtout au niveau du pourcentage des cellules marquées (cf. chapitre suivant) ; tandis que l'histogramme de répartition ne sera pas affecté : dans une zone émissive déterminée il sera voisin de la répartition de Poisson.

III - PARAMETRES DU MARQUAGE RADIOAUTOGRAPHIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ADULTE

Les caractéristiques du marquage cellulaire répondent, comme nous venons de le voir, à des lois relativement simples dans le SNC embryonnaire. Il en est tout autrement lorsque dans les mêmes conditions d'administration du marqueur, elles sont établies à l'âge adulte. La raison essentielle tient à la persistance d'un marquage résiduel dans les zones ventriculaires. En effet, après l'injection du précurseur environ la moitié des cellules ventriculaires est marquée. Après division, si une partie des cellules filles est rejetée dans la zone intermédiaire sous forme de neuroblastes (qui garderont un marquage définitif), la fraction restante des cellules filles ne quittera pas la zone ventriculaire. Elle se divisera à nouveau et sera à l'origine d'un nouveau contingent de neuroblastes dont le marquage sera diminué par rapport à celui du premier contingent. Le phénomène se reproduira jusqu'à l'épuisement de la zone ventriculaire. A côté des neurones marqués dont nous venons de schématiser l'origine, le SNC adulte comprendra deux types de neurones non marqués :

1°- les neurones dont la différenciation est antérieure à l'injection, 2°- les neurones contemporains ou postérieurs à celle-ci, mais faisant partie du contingent cellulaire non atteint par le précurseur (marquage flash).

Dans les générations successives de neurones marqués, le marquage moyen sera fonction du nombre de divisions qui sépare la différenciation cellulaire de l'injection du précurseur. Ce fait, s'ajoutant à l'étalement de la distribution du marquage qui caractérise une même génération (loi de Poisson), l'accumulation de générations différentes dans une structure adulte aboutira à une distribution finale pratiquement continue entre le marquage maximum et le marquage nul. Il en résulte l'impossibilité de fixer une démarcation entre les neurones contemporains de l'injection et ceux dont la différenciation est plus tardive. Pour contourner cet obstacle, la plupart des auteurs ne considèrent comme contemporains de l'injection que les neurones les plus marqués ; par là même sont éliminés du total les neurones contemporains à marquage intermédiaire. La proportion de ces derniers sera d'ailleurs très variable dans la mesure où l'appréciation du niveau maximum est subjective et dépend par exemple du contexte histologique : en effet un niveau déterminé de marquage sera estimé différemment suivant que la cellule marquée est seule dans le champ d'observation ou au contraire entourée de cellules plus marquées qu'elle.

Il est donc nécessaire de pratiquer un comptage réel des grains pour chaque cellule. Cependant dans le cas du tissu nerveux adulte, du fait du grand nombre des neurones et de leur large spectre de marquage, cette solution n'était pas concevable sans une automatisation poussée. Une fois résolu ce problème d'acquisition de données, nous nous sommes rapidement rendu compte que l'interprétation des résultats était impossible sur la base des seules données classiques de traitement quantitatif des radioautographies. En conséquence, nous avons poursuivi un double objectif, visant à établir les lois théoriques de marquage dans le SNC et à les exprimer avec le maximum de précision par quelques paramè-

tres sélectionnés. Au rang de ceux-ci, nous avons établi en premier lieu l'histogramme de fréquence des cellules en fonction de leur marquage. Nous avons déjà constaté que sa forme était "poissonnienne" dans le cas des zones ventriculaires embryonnaires. Or, si l'on s'adresse à une structure adulte comme le cortex cérébral, dont les couches sont formées par superposition de générations neuroblastiques successives (ANGEVINE et SIDMAN, 1961) une injection contemporaine des générations les plus anciennes conduira à des marquages cellulaires moyens décroissants suivant les couches. La couche neuronique contemporaine de l'injection sera la plus marquée, tandis que les couches qui lui succèdent le seront de moins en moins, au fur et à mesure que les cellules ventriculaires perdront leur marquage par divisions successives. L'histogramme représentatif de l'ensemble des couches, ou histogramme global, formé par l'addition des histogrammes partiels caractéristiques de chaque génération s'écartera donc nécessairement de la répartition de Poisson. Cette remarque est valable pour toutes les structures du SNC, car il n'existe pas de région dont l'équipement neuronal résulte d'un apport de cellules rigoureusement contemporaines. On ne peut se rapprocher du cas théorique qu'en réduisant l'analyse à des ensembles cellulaires très restreints, comme par exemple un champ microscopique à fort grossissement. Dans ce cas limite seulement et à condition que les cellules marquées contemporaines soient restées groupées au cours de leur migration, on devrait retrouver une répartition de Poisson. *Au total, la forme de l'histogramme global reflètera directement le degré d'hétérogénéité chronologique d'une région.*

Quelques paramètres très caractéristiques peuvent être extraits de cet histogramme : l'index de marquage, la moyenne des grains et le nombre de grains maximum. En prenant comme base de calcul les éléments précisés dans le chapitre précédent (degré d'homogénéité cellulaire, loi de répartition du marquage, caractéristiques moyennes du cycle), l'étude théorique de ces paramètres

envisage différents cas fondamentaux : selon que la durée d'équipement de la zone adulte porte sur 1,2,3, n cycles et que la date d'injection ait lieu plus ou moins tôt avant le début de formation de la région (1,2,3, n cycles auparavant), pendant le début de formation ou encore après (1,2,3, n cycles après). Nous avons en outre étudié ces paramètres lorsque varie le temps de disponibilité du précurseur (cf. modalités d'injection) ou les caractéristiques du cycle génératif. Nous avons enfin envisagé le cas particulier des variations topographiques de l'index de marquage et du pourcentage des cellules marquées quand la répartition des neurones répond à un processus de stratification chronologique. Ce processus, identifiable par des critères purement radioautographiques, ne s'exprimera pas nécessairement par une stratification cytoarchitectonique. Dans tous les cas, nous avons considéré que la population cellulaire était homogène, asynchrone et que le taux d'incorporation de l'ADN était constant pendant toute la durée de la phase S du cycle génératif.

Dans ce chapitre seuls figurent les résultats fondamentaux. La plupart des calculs intermédiaires, en particulier ceux qui concernent les histogrammes globaux ont été traités par ordinateur IBM 360. Un certain nombre d'abréviations ont été employées, leur signification est précisée par la figure 1 de la planche III A.

PLANCHE III A

NOMENCLATURE ET PARAMETRES INITIAUX.

Fig. 1 : Notation employée.

- TD : durée de disponibilité du précurseur
- TC : durée du cycle génératif
- t_0 : date de début du cycle cellulaire
- t_i : date de l'injection du précurseur
- C_i : cycle génératif contemporain de l'injection
- $t_a t_b$: date de début et de fin de phase de synthèse pour une cellule.
- TS : durée de synthèse
- G_1, G_2, M : phases du cycle génératif
- DF : date de début de formation de la structure étudiée
- MG : moyenne des grains
- P% : pourcentage des cellules marquées (index de marquage)
- K : marquage maximum (en nombre de grains)
- p : nombre de cycles génératifs nécessaires à la formation de la structure étudiée.
- q : intervalle entre t_i et DF (en Nb de cycles)
- CT : nombre total de cellules
- C^*T : nombre total de cellules marquées

Fig. 2 : Relation entre marquage et position de TD par rapport à TS (cf. texte).

Fig. 3 : Histogramme théorique obtenu pour TS = 5 heures, TC = 15 heures et TD = 30 minutes (nombre de grains maximum fixé par hypothèse à 100).

Cet histogramme ne tient pas compte des lois de la désintégration radioactive (répartition de Poisson).

- C^*T : nombre de cellules marquées
- G : nombre de grains.

PL III.A

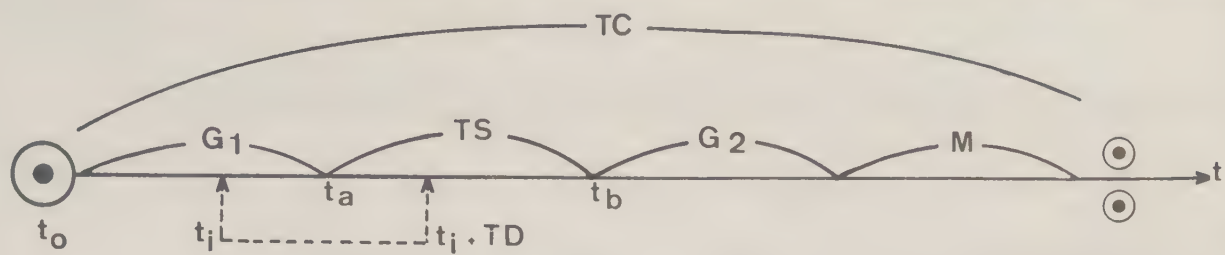


fig. 1

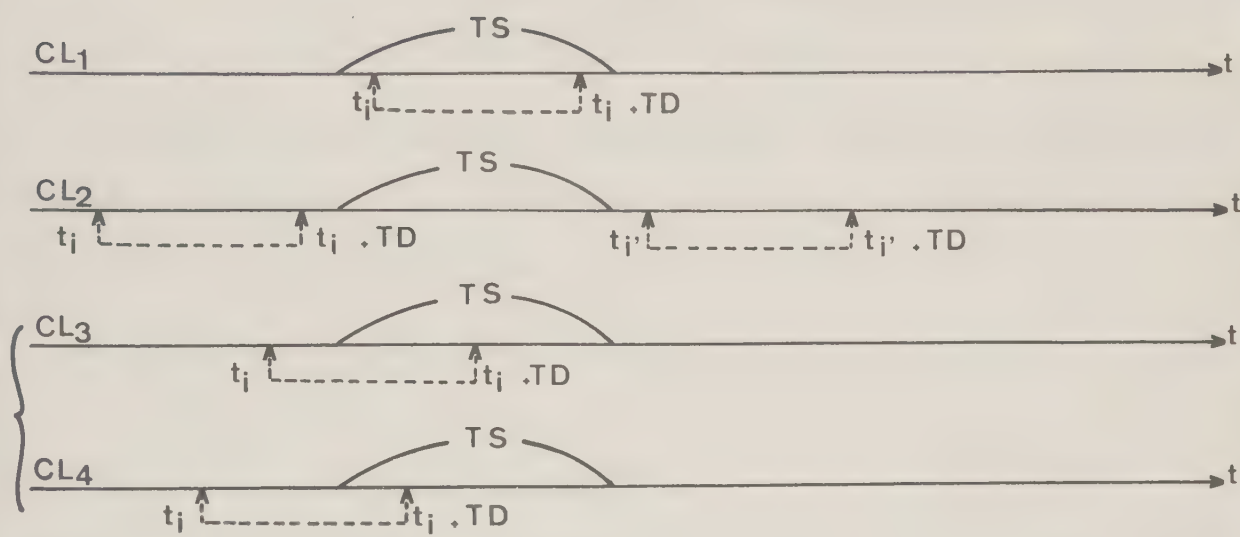


fig. 2

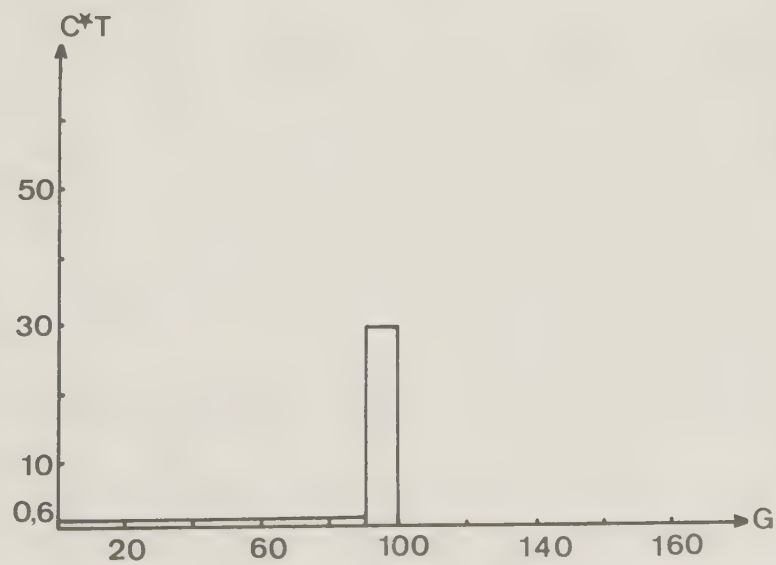


fig. 3

RESULTATS

A - Région composée de neurones de la même génération (histogrammes partiels)

1/ Région dont le début de formation est contemporain de la date d'injection :

a - Relation entre marquage et position de TD par rapport à TS (Pl. III A, fig. 2) :

1°/ Une cellule CL1 possèdera un marquage maximum quand la période de disponibilité du précurseur (TD) sera entièrement incluse dans la période de phase de synthèse (TS) de cette cellule. Ce qui se traduit par :

$$t_a < t_i < t_b - TD$$

soit

$$t_i \in |t_a, t_b - TD|$$

Les temps t_i se positionnant au hasard sur l'axe t_o , t d'une cellule donnée la probabilité pour cette cellule d'être marquée au maximum s'exprimera par la relation :

$$P_K = \frac{\text{mesure de } |t_a, t_b - TD|}{\text{mesure de } |t_o, t|}$$

d'où

$$P_K = \frac{TS - TD}{TC}$$

2°/ Une cellule CL2 ne sera pas marquée si elle entre en phase de synthèse quand le précurseur a cessé d'être disponible ou bien si elle termine sa phase de synthèse avant l'injection du précurseur. Ce qui se traduit par :

$$t_i < t_a \text{ ou } t_i > t_b$$

soit

$$t_i \in |t_0, t_a - TD| \text{ ou } t_i \in |t_b, t|$$

La probabilité pour cette cellule d'être non marquée sera donc :

$$p_o = \frac{\text{mesure de } |t_0, t_a - TD| + \text{mesure de } |t_b, t|}{\text{mesure de } |t_0, t|}$$

d'où

$$p_o = \frac{TC - TS - TD}{TC}$$

ou encore

$$p_o = 1 - \frac{TS + TD}{TC}$$

3°/ Une cellule CL3 sera plus marquée qu'une cellule CL4 si la correspondance TD/TS est plus grande pour CL3 que pour CL4.

Une cellule CL5 sera marquée à n grains, avec $\lambda\kappa < n < \mu\kappa$ ($0 < \lambda < \mu < 1$) si t_i se positionne sur l'axe t_0, t de la façon suivante :

$$t_a - (1-\lambda) TD < t_i < t_a - (1-\mu) TD \text{ soit } t_i \in I_1 \text{ ou } t_b - \mu TD < t_i < t_b - \lambda TD$$

soit $t_i \in I_2$ ce qui en probabilités se traduit par :

$$p_n = \frac{\text{mesure de } I_1 + \text{mesure de } I_2}{\text{mesure de } |t_0, t|}$$

d'où

$$p_n = \frac{2 |\lambda - \mu| TD}{TC}$$

b - Démonstration numérique de l'influence de la durée de marquage (correspondance TD,TS) sur l'histogramme de base :

* Marquage flash (30 minutes)

Valeurs numériques choisies :

K = 100 grains

TS = 5 heures

TC = 15 heures

TD = 30 minutes

Dans ces conditions on obtient :

$$P_0 = 63 \%$$

$$P_{100} = 30 \%$$

$$P_n = 0,6 \% \text{ pour } 0 < n < 10 ; 10 < n < 20 ; 20 < n < 30 ; \\ \dots\dots\dots 90 < n < 100.$$

On peut donc construire un histogramme théorique (Pl. III A, fig. 3) qu'il sera nécessaire de corriger pour tenir compte des lois statistiques de désintégration (loi de Poisson). L'histogramme ainsi obtenu (Pl. III B, fig. 1) permet de déduire les paramètres caractéristiques suivants :

MG (moyenne des grains) =..... 90

P% (pourcentage des cellules marquées)=..... 37 %

* Marquage 1 h 30

Pour les mêmes valeurs numériques que précédemment (sauf TD = 1 h 30) on obtient la répartition théorique suivante :

$$P_0 = 56 \%$$

$$P_{100} = 23 \%$$

$$P_n = 2 \%$$

PLANCHE III B

HISTOGRAMMES PARTIELS ET GLOBAUX.

Fig. 1 : Histogramme partiel de répartition (Pl. III A, fig. 3) corrigé suivant la loi de Poisson.

Fig. 2 : Histogramme global caractérisant une région formée en 2 cycles et dont le début de formation coïncide avec l'injection. Noter l'évolution par rapport à l'histogramme partiel de la fig. 1.

Fig. 3 : Histogramme partiel corrigé suivant la loi de Poisson, montrant la déformation de l'histogramme lorsque le temps de disponibilité du pr curseur (TD) augmente.

PL III.B

CT = 200

TD = 30mn

C*T = 74

t_i = DF

P% = 37%

p = 1C

MG = 90



CT = 200

TD = 30mn

C*T = 73

t_i = DF

P% = 365%

p = 2C

MG = 67



CT = 200

TD = 2h30

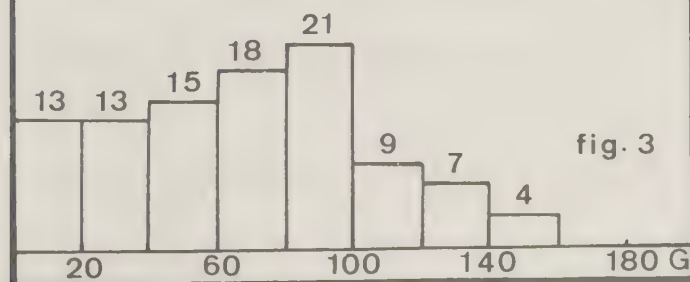
C*T = 100

t_i = DF

P% = 50%

p = 1C

MG = 50



20

60

100

140

180 G

* Marquage 2 h 30

Répartition théorique

$$P_0 = 50 \%$$

$$P_{100} = 17 \%$$

$$P_n = 3,3 \%$$

2/ Régions dont le début de formation est postérieur de n cycles à la date d'injection :

Les neurones constituant ce type de régions seront les descendants des cellules marquées peu après l'injection.

Théoriquement, la loi de répartition y sera la même que pour les cas traités précédemment, mais à une échelle 2 n fois plus grande. Les caractéristiques "poissonniennes" de l'histogramme s'atténuent pour le cas n = 1 (Pl. III D, fig. 7) et disparaissent pour n = 2 (Pl. III D, fig. 12).

En résumé, ces régions sont caractérisées par un pourcentage de cellules marquées analogue aux cas précédents, mais avec une moyenne de grains 2n fois plus faible.

3/ Régions dont le début de formation est antérieur à la date de l'injection :

Si ce début de formation a lieu un cycle avant l'injection, comme la durée de formation se déroule sur un cycle, aucune cellule ne sera marquée de ce fait.

B - Répartition du marquage dans une région composée de neurones de générations successives (histogrammes globaux)

On considérera différents cas suivant que la structure comporte p

PLANCHE III C

EVOLUTION DES HISTOGRAMMES (1).

Cas. 1, 2, 3, 4, 5, 6 :

Evolution des histogrammes globaux lorsque la formation débute au moment où a lieu l'injection et s'étend de 1 à 6 cycles génératifs.

PL III.C

DEBUT DE FORMATION = DATE D'INJECTION

DUREE DE DISPONIBILITE = 1h30

1

CT = 200
C*T = 88
P% = 44%
MG = 75
p = 1 C



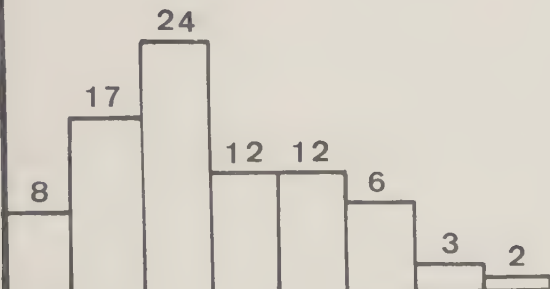
4

CT = 200
C*T = 70
P% = 35%
MG = 42
p = 4 C



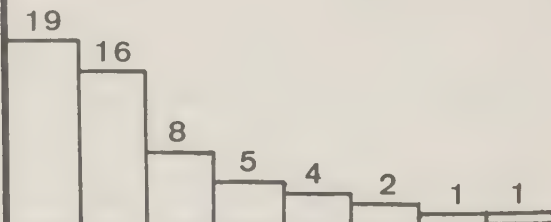
2

CT = 200
C*T = 84
P% = 42%
MG = 56
p = 2 C



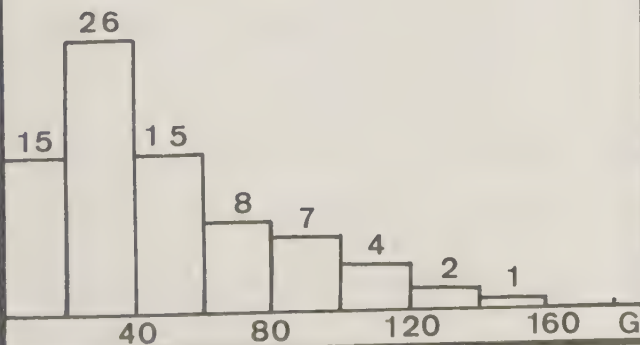
5

CT = 200
C*T = 56
P% = 28%
MG = 39
p = 5 C



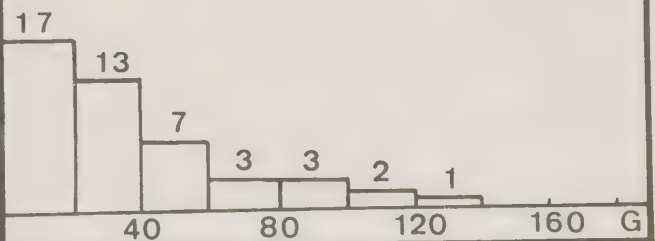
3

CT = 200
C*T = 79
P% = 39,5%
MG = 48
p = 3 C



6

CT = 200
C*T = 46
P% = 23%
MG = 35
p = 6 C



génération, séparées par p cycles ($p = 2,3,4,5,6$). La durée de marquage envisagée sera de 1 h 30.

1/ Régions dont le début de formation est contemporain de l'injection :

Sur N cellules de chacune de ces régions, le nombre $\frac{N}{p}$ de cellules provenant des cycles successifs se définit comme suit :

Rang du cycle génératif	P %	MG	Histogramme
1er	44 %	75	type 1 (Pl. III C)
2è	légèrement inférieur à 44 %	$\frac{75}{2}$	identique, mais à échelle réduite de 2
p è	très inférieur à 44 %	$\frac{75}{2^p}$	identique, mais à échelle réduite de 2^p

L'addition de ces histogrammes partiels a permis de tracer les histogrammes de synthèse pour $p = 2,3,4,5$ et 6 (Pl. III C). Les cellules portant en théorie moins de 3 grains n'ont pas été considérées comme marquées. La figure 2 de la planche III B donne un exemple comparable, mais avec un TD de 30 minutes.

2/ Régions dont le début de formation est postérieur de q cycles à la date d'injection :

Le cas $q = 1$ a été étudié en détail (Pl. III D, cas 7,8,9,10,11) avec une durée totale de formation correspondant à 1,2,3,4,5 cycles génératifs. Si $q > 1$, les histogrammes tendent à se rapprocher de l'axe Y (Pl. III D, cas 12). Toutes ces régions se caractérisent par des pourcentages forts, pratique-

ment invariables avec q, et par des moyennes de grains très faibles, qui suivent une loi en $\frac{1}{2^q}$ quand q augmente.

3/ Régions dont le début de formation est antérieur de q cycles à la date de l'injection :

* Si $q = 1$, la région se formant en p cycles, $\frac{N}{p}$ des cellules ne seront pas marquées. La moyenne des grains sera donc identique à celle de l'histogramme de base (voir discussion), mais le pourcentage sera plus faible, soit :

$$p \% = \frac{(p - 1) \times P \% \text{ base}}{p}$$

Histogramme = identique à l'histogramme de base, à une diminution verticale près.

* Si q = quelconque, on peut écrire :

MG = légèrement inférieure à MG base

$$P\% = \text{très inférieur à } P\% \text{ base} = \frac{(p - q) \times P\% \text{ base}}{p}$$

Histogramme = identique au précédent.

C - Influence de p, TC et Ts sur P% et MG

On envisage le cas d'une région composée de neurones de générations successives et dont le début de formation est contemporain de l'injection :

1/ Influence de p sur P% et MG

Les courbes de MG et P% descendent quand p augmente (Pl. III E, fig. 1 et 2).

2/ Influence de TC et TD sur P%

On suppose TS = constant = 5 H, avec des variations de TC al-

PLANCHE III D

EVOLUTION DES HISTOGRAMMES (2).

Cas, 7,8,9,10,11 :

Evolution des histogrammes globaux à partir de l'histogramme partiel (7) quand la durée de formation de la zone s'étend de 1 à 5 cycles et lorsque le début de formation intervient 1 cycle après la date d'injection.

Cas 12 :

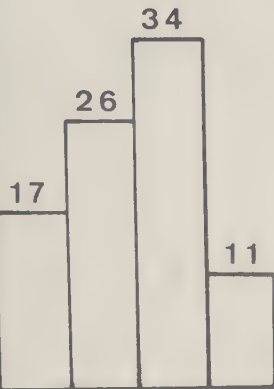
Histogramme partiel (une génération cellulaire) obtenu dans une région dont le début de formation intervient 2 cycles après la date d'injection.

PL III.D

DUREE DE DISPONIBILITE = 1 h 30

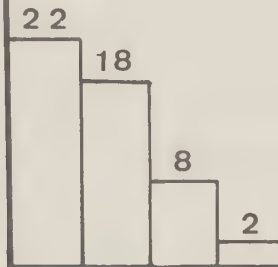
7

CT = 200
 $\bar{C}^*T = 88$
 P% = 44 %
 MG = 37,5
 $t_i = DF-1C$
 p = 1C



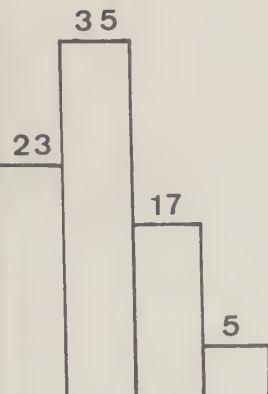
10

CT = 200
 $\bar{C}^*T = 50$
 P% = 25 %
 MG = 21
 $t_i = DF-1C$
 p = 4C



8

CT = 200
 $\bar{C}^*T = 80$
 P% = 40 %
 MG = 28
 $t_i = DF-1C$
 p = 2C



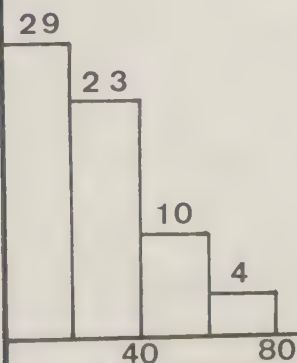
11

CT = 200
 $\bar{C}^*T = 40$
 P% = 20 %
 MG = 17
 $t_i = DF-1C$
 p = 5C



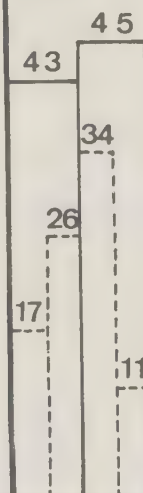
9

CT = 200
 $\bar{C}^*T = 66$
 P% = 33 %
 MG = 24
 $t_i = DF-1C$
 p = 3C



12

CT = 200
 $\bar{C}^*T = 88$
 P% = 40 %
 MG = 19
 $t_i = DF-2C$
 p = 1C



40 80 120 160 G

lant de 8 à 24 heures, le pourcentage des cellules marquées est obtenu par la formule : $P\% = \frac{TS + TD}{TC} \times 100$.

Dans ces conditions, en faisant varier la durée du cycle, on obtient différentes hyperboles suivant les valeurs de TD (Pl. III E, fig. 3).

3/ Influence de TS et TD sur P%

Si TC = constant = 20 heures, avec des variations de TS allant de 5 à 10 heures, l'application de la formule précédente démontre que les courbes sont des droites (Pl. III E, fig. 4).

D - Variations de P% et MG liées aux caractéristiques de stratification cellulaire

L'observation montre que les neurones se disposent très souvent dans les structures d'une manière stratifiée, dans un ordre chronologique. Cette particularité ne change rien à la théorie des histogrammes. Il est cependant nécessaire, pour interpréter l'évolution de P% et MG d'une couche à l'autre, d'envisager séparément le cas d'une stratification stricte et celui d'une stratification avec chevauchement.

1/ Stratification sans chevauchement (Pl. III F)

Les neurones d'une même génération occupent dans ce cas la totalité d'une couche et la structure dans son ensemble peut être assimilée à un empilement de compartiments, dont chacun est constitué par une population homogène. Si l'injection intervient lors du cycle C_i , on pourra observer une succession de vagues marquées venant occuper les différentes couches : $C_i + 1$, $C_i + 2$, $C_i + 3$ et ainsi de suite. Les caractéristiques de ces couches respectives sont alors étudiées suivant la théorie des histogrammes (cas de la réparti-

PLANCHE III E

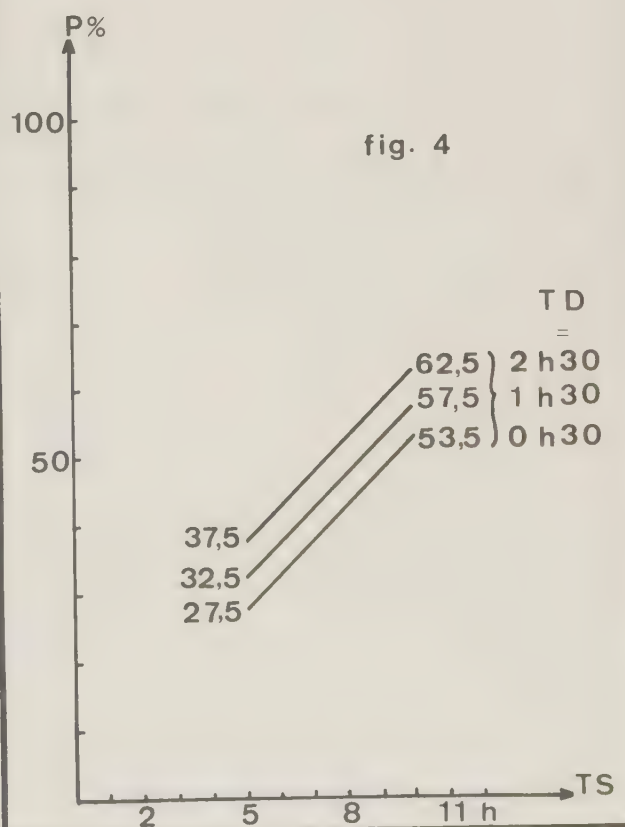
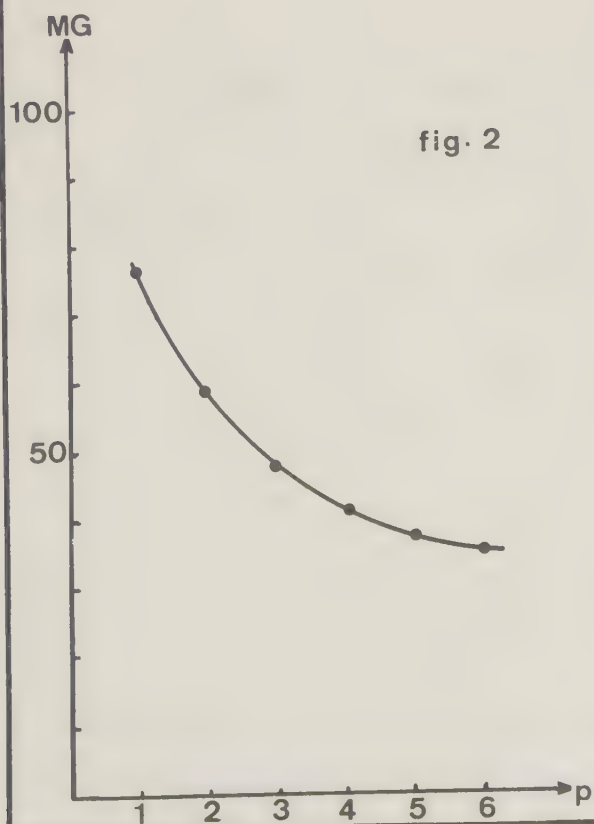
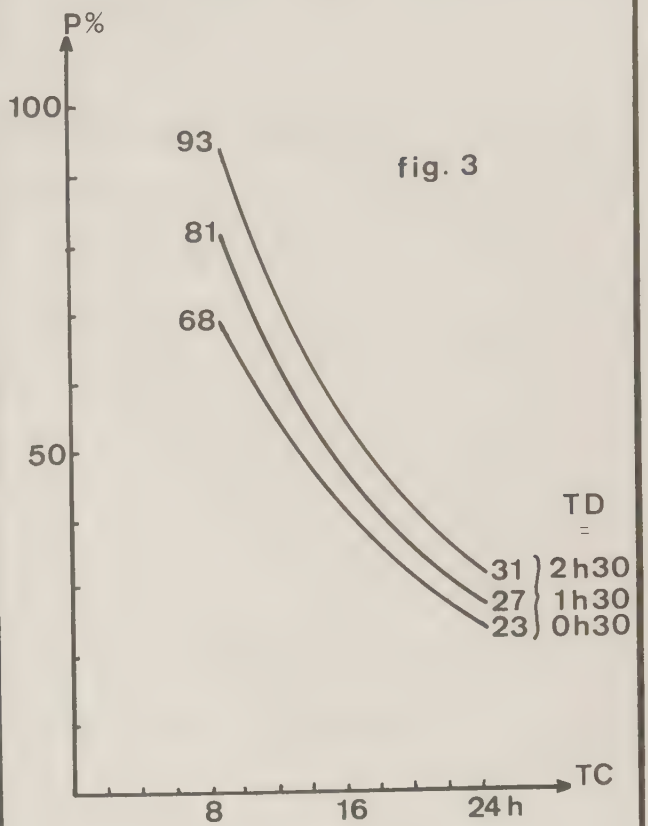
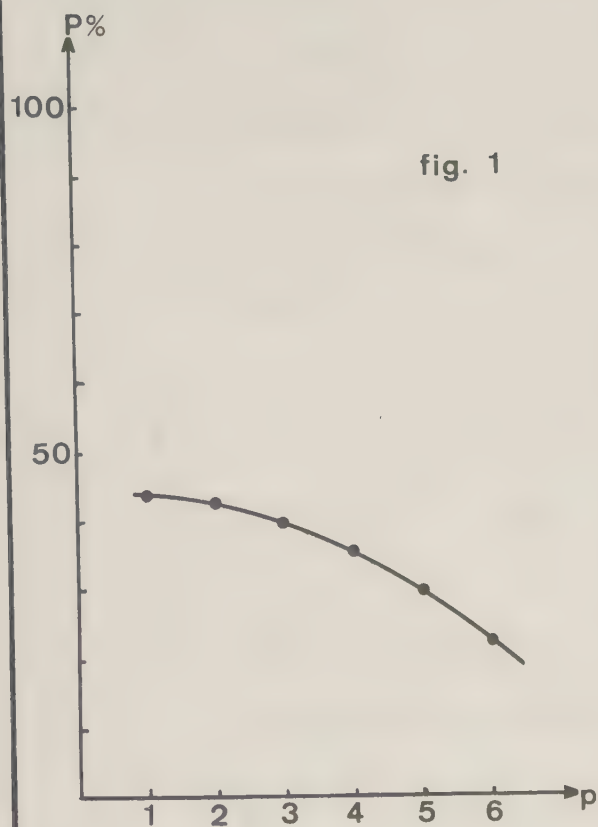
VARIATIONS DE P% ET MG.

Fig. 1 et 2 : Variation du pourcentage des cellules marquées (P %) et de la moyenne des grains (MG) lorsque la durée de formation de la structure s'étend de 1 à 6 cycles génératifs.

Fig. 3 : Courbes d'évolution du P% lorsque le cycle génératif s'allonge. On suppose la durée de la phase de synthèse constante (TS = 5 heures). 3 cas sont envisagés, avec des temps de disponibilité de 0 h 30, 1 h 30, et 2 h 30.

Fig. 4 : Courbes d'évolution du P% en fonction de la durée de synthèse (TS). La durée du cycle génératif est supposée constante et égale à 20 heures.

PL III-E



tion du marquage dans une zone composée de générations successives). Quatre cas sont envisagés.

. Générations cellulaires antérieures à l'injection :

le marquage est nul pour ces générations ($C_i - n$, $C_i - 2$, $C_i - 1$)

. Génération contemporaine de l'injection (C_i) :

dans le cas d'un marquage flash (TD = 30 minutes), on obtient

$$CT : 200$$

$$C^*T : 74$$

$$MG : 93$$

$$P\% : 37$$

. Génération postérieure d'un cycle à l'injection ($C_i + 1$) :

L'histogramme est comparable, mais réduit de moitié.

$$MG : \frac{MG(C_i)}{2}$$

$$P\% : \text{inchangé}$$

. Génération postérieure de 2 cycles à l'injection ($C_i + 2$) :

L'histogramme est toujours comparable mais réduit de moitié par rapport à $C_i + 1$.

$$MG : \frac{MG(C_i)}{2}$$

$$P\% : \text{inchangé}$$

En conclusion, dans le cas d'une stratification stricte, le pourcentage des cellules marquées reste inchangé, tandis que la moyenne des grains diminue suivant une loi en $\frac{MG}{2}$. Une remarque s'impose cependant. La constance du pourcentage n'est en effet concevable que dans l'hypothèse d'un seuil de sensibilité radioautographique infiniment bas, qui seul permettrait la détection du

PLANCHE III F

STRATIFICATION SANS CHEVAUCHEMENT.

Courbes d'évolution de la moyenne des grains (MG) et du pourcentage des cellules marquées (P%).

Les unités portées en ordonnées sont arbitraires. Les strates cellulaires sont représentées en abscisses : C_{i-3} à C_{i+5} . (C_i = cycle qui coïncide avec l'injection du précurseur). En trait plein, sont figurées les courbes obtenues dans le cas théorique d'un seuil de sensibilité radioautographique infiniment bas ; en pointillé, les courbes corrigés tenant compte de la disparition progressive des cellules en raison de la dilution de leur marqueur.

Le seuil de comptage a été fixé à 10 grains. On remarquera l'incidence de la correction sur la courbe MG.

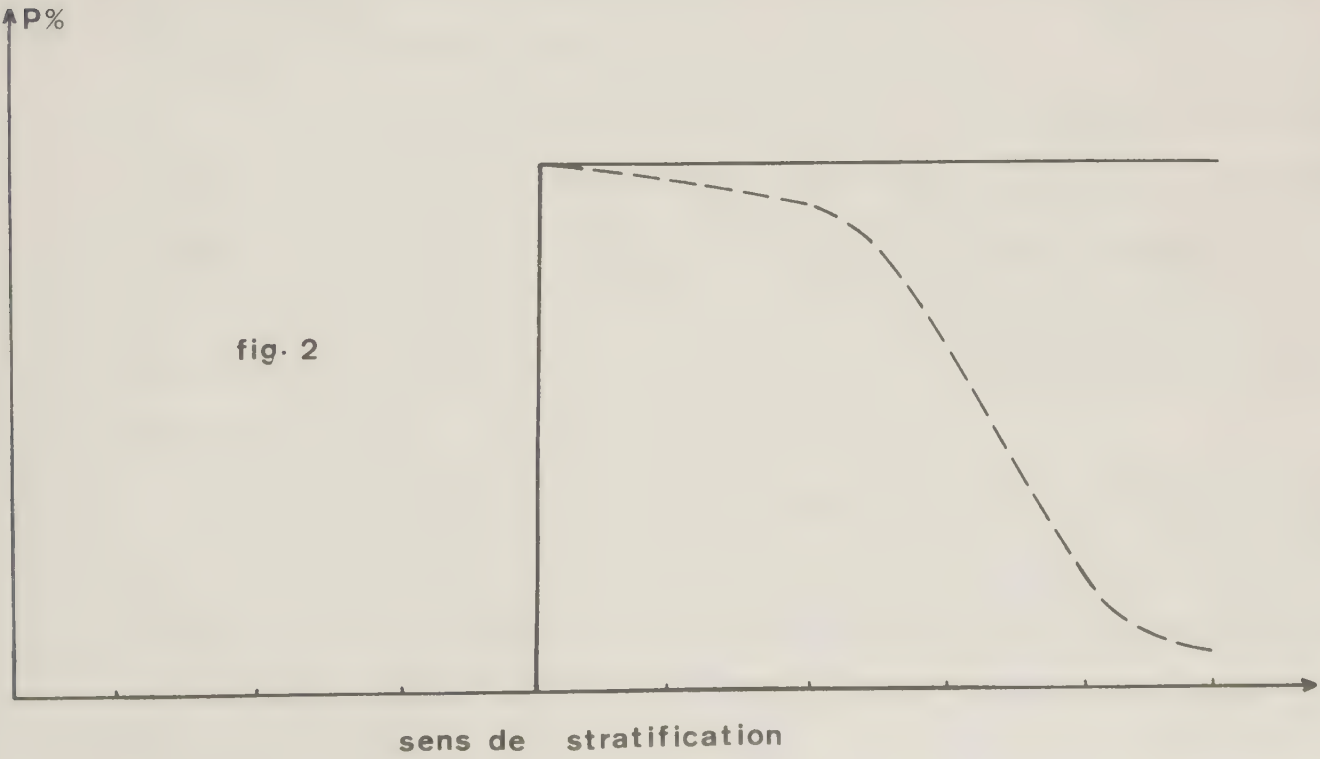
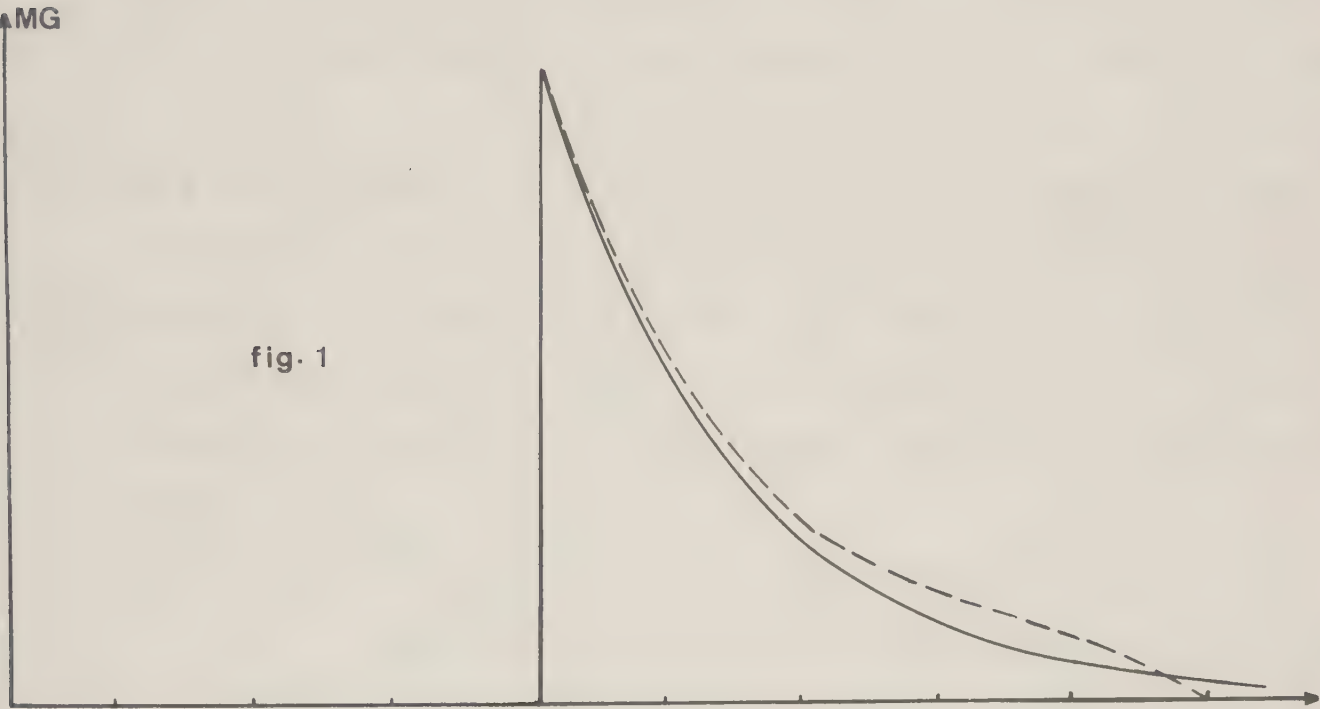
Conditions expérimentales et caractéristiques du marquage en C_i .

TC = 15 heures
TD = 30 minutes
CT = 200
 C^*T = 74
MG = 93
P% = 37

PL III.F

	$c_i - 3$	$c_i - 2$	$c_i - 1$	c_i	$c_i + 1$	$c_i + 2$	$c_i + 3$	$c_i + 4$	$c_i + 5$
--	-----------	-----------	-----------	-------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

↑
injection



marquage quel que soit le degré de dilution du traceur au cours des divisions cellulaires successives. Mais, en pratique, le seuil de sensibilité n'atteint pas ce niveau, ce qui explique la diminution effective du pourcentage, un nombre de plus en plus grand de cellules n'ayant plus un nombre de grains suffisant pour être différenciées du "bruit de fond" ou, à la limite, n'ayant pas une radioactivité suffisante pour donner naissance à un grain. Toutes les courbes de pourcentage peuvent être corrigées pour tenir compte de ce fait. La correction étant directement fonction des caractéristiques initiales du marquage (nombre de grains par cellule et histogramme), elle sera d'autant plus faible que le marquage initial aura été plus fort. D'autre part, les cellules à faible marquage ayant tendance à disparaître, on est également conduit à corriger les courbes de moyenne des grains ; pratiquement, cette correction est toujours faible.

2/ Stratification avec chevauchement (Pl. III G)

Dans la réalité, la stratification chronologique des couches n'est jamais parfaitement pure et leur interpénétration rend nécessaire de considérer ce phénomène comme étant de type statistique.

Par rapport au cas précédent et pour les couches $C_i + n$, l'évolution de P% et de MG suit une loi comparable, à ceci près que le chevauchement des couches interdit de les considérer comme des compartiments homogènes. Les histogrammes globaux s'obtiendront alors par addition des histogrammes partiels successifs. On constate ainsi que les courbes MG et P% ne sont que légèrement modifiées.

Au contraire, des différences fondamentales s'observent pour les couches en $C_i - n$. En principe, elles ne sont pas marquées du fait de leur antériorité par rapport à l'injection. Le chevauchement explique qu'on y trouve cependant un certain nombre de cellules marquées, dont l'âge est très postérieur à

PLANCHE III G

STRATIFICATION AVEC CHEVAUCHEMENT.

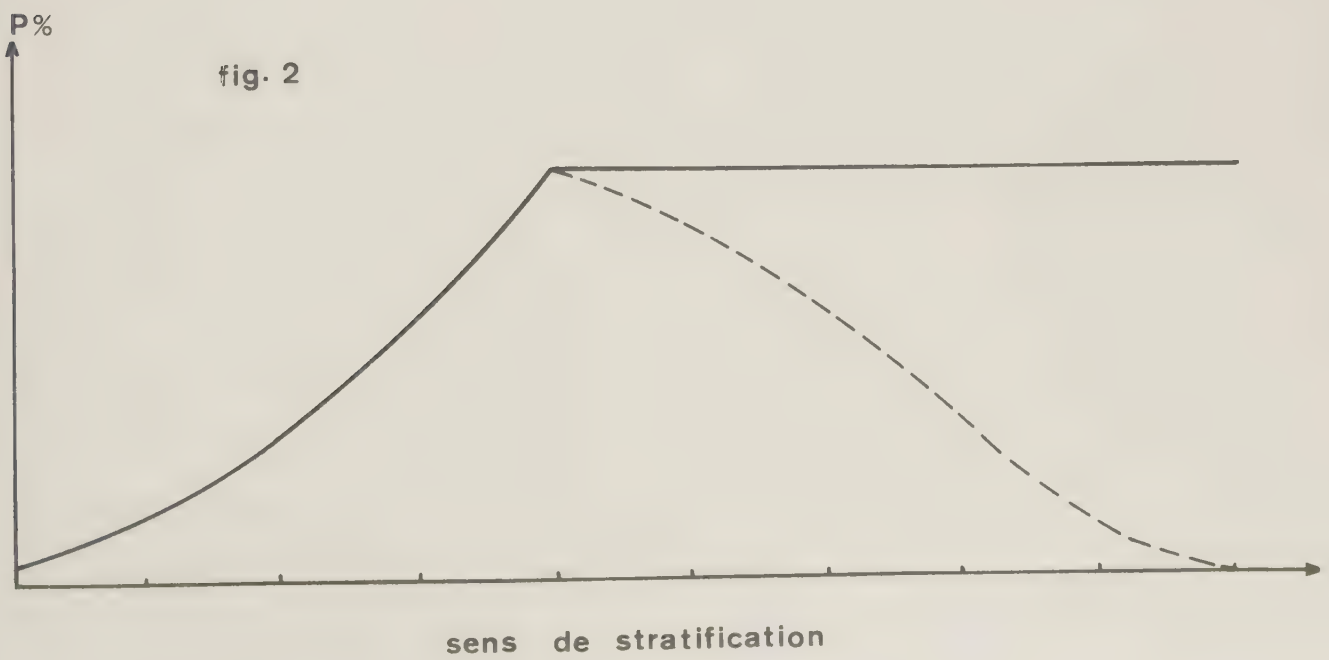
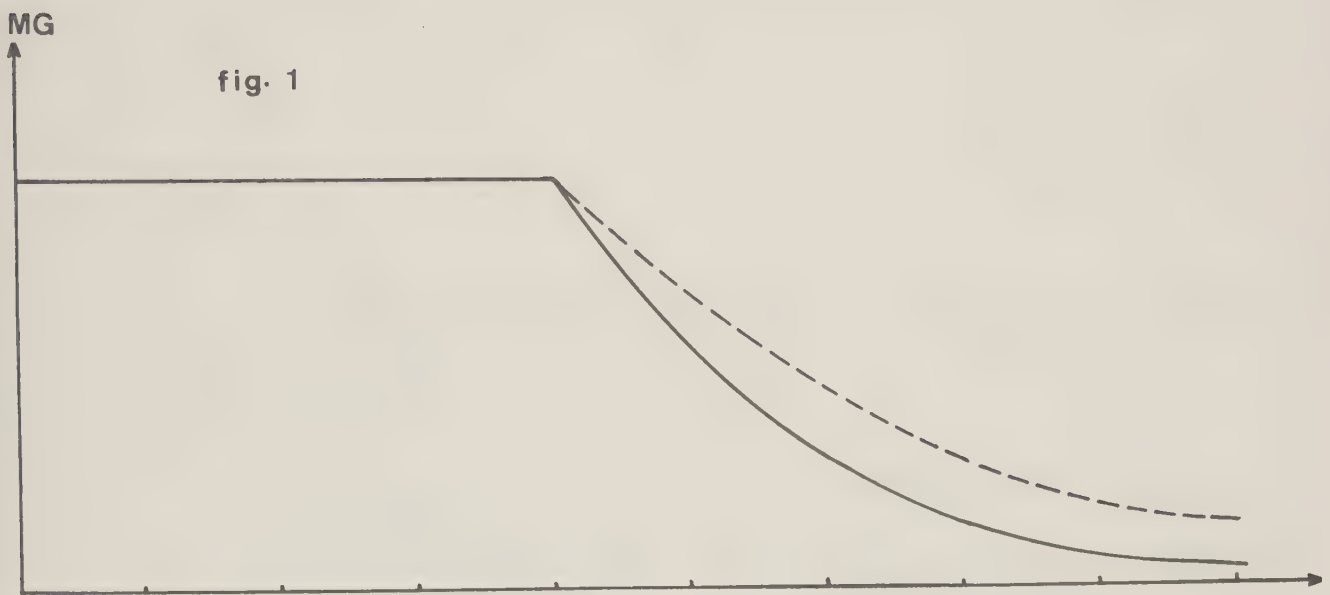
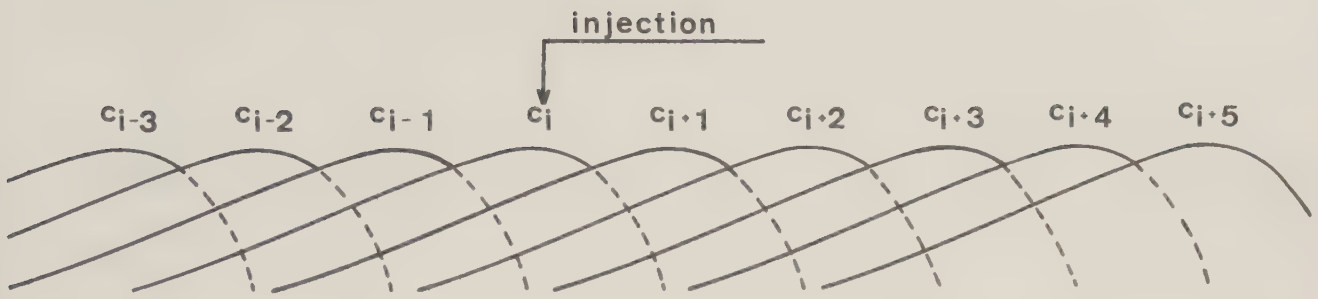
Courbes d'évolution de la moyenne des grains (MG) et du pourcentage de cellules marquées (P%).

En ordonnées, les unités sont arbitraires. En abscisses, sont représentées les strates cellulaires de C_{i-3} à C_{i+5} . En haut de la planche, sont schématisés les chevauchements des différentes générations.

On remarquera les différences fondamentales existant entre ces courbes et celles de la planche III F en ce qui concerne les parties situées entre l'origine des axes et la date d'injection.

Conditions expérimentales et caractéristiques de marquage identiques à celles de la Planche III F.

PL III-G



celui de ces couches. Ces cellules, même en nombre restreint, possèdent une moyenne de grains qui est celle de toute la génération à laquelle elles appartiennent. En conséquence, aussi poussé que soit le chevauchement des couches marquées et non marquées, la courbe de la moyenne des grains restera sensiblement constante tandis que la courbe de pourcentage sera directement fonction du taux de ce chevauchement. A la limite, le chevauchement maximal, équivalent à un recouvrement, conduirait à la disparition du gradient chronologique dans la structure.

DISCUSSION

A - Régions neuroniques composées d'une seule génération cellulaire (histogramme partiel).

Cette hypothèse a permis de calculer l'histogramme de base à partir duquel sont déduits tous les autres cas. Si le marquage est très bref et en ne tenant pas compte des fluctuations de la désintégration radioactive, toutes les cellules devraient avoir un nombre de grains identique. En réalité nous avons constaté qu'il n'existe pas de marquage véritablement instantané et que le temps de disponibilité des molécules injectées est de l'ordre de 15 minutes. Dans la pratique, la difficulté d'obtenir un marquage bref est d'autant plus accentuée que la voie de pénétration du précurseur est indirecte. A ce point de vue l'injection intrafoetale est donc plus adéquate. Pour les modes d'injection différents, seule une faible fraction de la dose injectée parvient aux tissus embryonnaires ; le restant est dilué dans les compartiments liquidiens ou s'intègre dans l'ADN des populations cellulaires maternelles en prolifération. En conséquence, lors de la disparition des cellules maternelles marquées

à vie courte une certaine quantité de précurseur pourra se retrouver en circulation. Son intégration ultérieure dans les populations embryonnaires prémitotiques pourrait ainsi contribuer à l'étalement de l'histogramme (GALASSI, 1967). Quoi qu'il en soit et même sans tenir compte de cette dernière particularité, l'existence d'un temps de disponibilité de plusieurs minutes nécessitera une correction de l'histogramme de répartition. A celle-ci il faudra ajouter la correction due aux lois de désintégration (loi de Poisson) et c'est finalement cet histogramme doublement corrigé qui constituera l'histogramme partiel. Cet histogramme s'observe peu après l'injection au niveau des zones ventriculaires embryonnaires, mais chez l'adulte il est très improbable de le retrouver. En effet, si l'on analyse une région déterminée *a priori*, il y a peu de chance pour qu'elle ne soit composée que d'une génération cellulaire et surtout que cette génération soit exactement contemporaine de l'injection. En admettant l'existence de régions composées d'une seule génération : 1°- si l'injection est postérieure à leur formation aucun marquage ne sera observé. 2°- si l'injection est antérieure à leur formation le P% demeurera inchangé, la MG diminuera et l'histogramme de base perdra ses caractéristiques "poissonniennes" par tassement contre l'axe des ordonnées.

B - Régions neuroniques composées de plusieurs générations cellulaires (histogrammes globaux)

Bien que les lois fondamentales précédentes se retrouvent dans ce cas, il existe une différence principale qui tient à la forme des histogrammes globaux. Ceux-ci résultent pratiquement dans tous les cas de l'addition d'histogrammes partiels ; il n'est donc plus question ici de répartition de Poisson. Mais la forme générale de ces histogrammes constitue un indice irremplaçable, qui sera utilisé conjointement avec les autres paramètres de la façon décrite

ci-dessous. Trois cas sont à considérer :

1°/ L'histogramme a une forme "semi-poissonnienne", avec un pic proche du maximum de grains observé :

- P% fort (40 à 50 %) indiquera une région "pure", c'est-à-dire dont toutes les cellules se seront formées dans une période courte (15 h), à proximité de la date d'injection.

- P% faible indiquera une région formée en n cycles, mais antérieure de n + 1 cycles à la date de l'injection.

2°/ L'histogramme est très allongé (maximum de grains élevé), avec une forme plate sauf près de l'origine :

- P% assez élevé (23 à 28 %) indiquera une région dont la formation s'est étalée sur plusieurs cycles à partir de la date d'injection.

- P% très faible indiquera une région dont la formation s'est faite en plusieurs cycles, avec un début antérieur à la date d'injection.

En la matière, c'est la moyenne des grains qui servira à déterminer l'ancienneté de la structure à partir de la date de l'injection. Un exemple le montrera :

Considérons une région présentant les caractéristiques suivantes :

- histogramme plat sauf près de l'origine,
- P% faible = 10 %
- MG = 60

La figure 2 de la planche III E nous indique le nombre de cycles postérieurs à l'injection (approximativement deux cycles). On a donc $p - q \neq 2$; on a vu précédemment que : $P\% = \frac{(p-q) \times (P\% \text{ base})}{p}$; le P% de base = 42 (Pl. III C, Cas 2) d'où $10 = \frac{2 \times (P\% \text{ base})}{p} = \frac{84}{p} = p \neq 8$.

On peut ainsi conclure que la structure a commencé à se former 6 cycles avant l'injection pour se terminer 2 cycles après.

3°/ L'histogramme n'a pas de forme caractérisée, car il est très tassé vers l'axe des ordonnées :

La structure sera donc dans tous les cas postérieure à l'injection. La moyenne des grains, très faible, permettra ici encore de déterminer approximativement la date de début et de fin de formation, en se référant au maximum de grains observé par comparaison avec le nombre maximal des grains. Par exemple : 40 cellules sur 100 sont marquées avec un maximum de densité en grains de 40 et une moyenne $MG = 18$, en se reportant à l'histogramme de base (Pl. III C, Cas 1) on extrait $MG \text{ base} = 75$ et densité maximale base = 160 d'où $40 = \frac{160}{2^q}$ et $q = 2$. La zone débute donc 2 cycles après l'injection. D'autre part $18 = \frac{75}{2^p}$ ce qui donne $p = 2$. On peut en déduire que la zone ne comprend qu'une génération cellulaire puisque $p - q = 0$.

C - Détermination de la date d'origine des neurones

Cette méthode implique l'identification des neurones contemporains d'une injection prénatale effectuée à une date connue. En injectant différentes femelles gestantes à des dates successives le calendrier de la formation des régions peut ainsi être établi. Nos résultats démontrent la faiblesse de la méthode si le critère d'appartenance à la génération contemporaine est seulement basé sur le nombre de grains maximum :

1°/ En condition de marquage flash (pulse labelling) le P% n'est jamais de 100 %. Dans de bonnes conditions : TC : 10 h ; TS : 5 h et TD : 0,30 h, il pourra atteindre 70 %. En réalité TD est plus faible, aussi si on l'estime à 10 minutes faut-il s'attendre à ne marquer que 55 % des cellules de la génération.

2°/ Lorsque le cycle génératif s'allonge et sachant que TS varie peu (cf. résultats prénataux) le P% décroîtra encore. En fixant TC à 20 h, TS à 5 h et

TD à 0,30 h le pourcentage des cellules marquées ne sera que de 27,5 % !

Sur ce total seulement 5% seront marquées au maximum ($P_K = \frac{TS - TD}{TC}$).

Le faible pourcentage des cellules marquées et surtout la variation de ce paramètre en fonction du stade injecté expliquent l'impossibilité rencontrée jusqu'à présent d'interpréter quantitativement les patterns de marquage, fait qui a été souligné par RAKIC et SIDMAN (1968) dans leur étude sur une structure pourtant simple et peu étendue du SNC, l'organe sub-commissural.

3°/ En augmentant le temps de disponibilité on pourra dans une certaine mesure augmenter le P%. Ainsi si on fait passer TD de 30 minutes à 2 h 30 le pourcentage passera de 37 % à 50 % (Pl. III B, fig. 1 et 3), mais dans le même temps le nombre des cellules moyennement ou faiblement marquées passera de 43 à 80 tandis que le nombre des cellules fortement marquées décroîtra :

TD	0 h 30	2 h 30	On suppose : CT = 200 $t_i = DF$ p = 1 cycle
Cellules moyennement ou faiblement marquées	37	80	
Cellules fortement marquées	31	20	
P %	37 %	50 %	

D - Détermination des caractéristiques de stratification
(Le concept de *Chronoarchitectonie*)

Dans le paragraphe précédent nous insistions principalement sur l'importance des variations du P% en fonction des stades injectés. La méconnaissance d'un tel phénomène rend impossible toute tentative de quantification, d'autant plus que dans les exemples choisis il s'agissait d'histogrammes partiels (1 génération).

Dans un cas cependant, P% peut rester constant : si l'on observe le marquage non pas sur des animaux injectés à des stades différents mais sur un même animal et dans des régions différentes. Ceci implique que l'analyse ne soit plus limitée aux cellules les plus marquées mais étendue à l'ensemble des cellules marquées. Dans ces conditions, il est possible de procéder à des comparaisons *chronoarchitectoniques* c'est-à-dire portant sur la chronologie et les caractéristiques de stratification :

1°/ Une chronologie comparée peut être établie entre les régions selon un coefficient qui ne sera pas le stade de gestation mais le nombre de cycles génératifs. Ceci permet d'éliminer les erreurs dans la détermination du stade de gestation. Si l'injection a lieu dans les tout premiers stades de la formation du tube neural la chronologie de l'ensemble du SNC pourrait en théorie être établie en utilisant un seul animal.

2°/ Les caractéristiques de stratification c'est-à-dire l'étendue du chevauchement et son importance quantitative sont déductibles de l'étude graphique des variations spatiales du P% et de la MG.

En conclusion, les lois d'organisation des paramètres radioautographiques dans le SNC adulte, après marquage prénatal de l'ADN des neurones, se révèlent plus complexes que celles mises en évidence par d'autres auteurs dans des tissus différents (WIMBER, 1963 ; QUAESTLER, 1963). Ceci tient essentielle-

ment au comportement particulier des neuroblastes qui cessent de se diviser et conservent leur marquage après émission hors de la zone V.

Les règles qui ont été dégagées dans ce chapitre permettent l'interprétation des patterns radioautographiques et sont à la base du concept de *chronoarchitectonie*.

IV - ANALYSE CHRONOARCHITECTONIQUE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ADULTE

Le marquage prémitotique des neurones par la thymidine tritiée, injectée à des jours différents de la gestation, permet en principe de suivre chronologiquement l'équipement neuronique des structures nerveuses. Malheureusement, les neurones réellement contemporains de l'injection ne peuvent pas être tous marqués (marquage flash) et ceux qui le sont ne représenteront qu'une minorité parmi la masse des neurones marqués appartenant à des générations postérieures à l'injection. Certes, les cellules contemporaines de l'injection posséderont le nombre de grains le plus élevé, mais nous avons vu qu'il faut s'attendre à trouver tous les intermédiaires entre ce niveau et le marquage nul. La solution qui consiste à diviser l'ensemble des cellules marquées en 2 sous-ensembles (marquage fort et marquage faible) est donc arbitraire et ne peut conduire qu'à des résultats qualitatifs approchés, surtout lorsque l'évaluation du niveau de marquage est visuelle.

La méthode quantitative que nous avons employée implique l'analyse photométrique de toutes les cellules marquées et l'utilisation des règles d'organisation exposées précédemment. Elle conduit à des résultats qualitatifs et quantitatifs précis. On peut ainsi établir la séquence neuronique constitutive d'une région déterminée, c'est-à-dire le début, la durée et la fin de

formation, ainsi que les courbes de répartition de l'approvisionnement neuro-nique en fonction du temps (pour une ou plusieurs populations s'il y a lieu).

Lorsque la région est caractérisée par un gradient, on pourra déduire de ces résultats les lois de stratification et tracer les courbes isochrones (*vide infra*). Mais, en pratique, une telle analyse systématique de l'ensemble du SNC est totalement inconcevable dans l'état actuel du développement de nos techniques. Seuls des automatismes poussés, surtout en matière de traitement numérique, permettent de l'envisager. Néanmoins, il est possible d'établir une partie des paramètres de la séquence constitutive et la totalité des lois de stratification sans passer par l'analyse totale. La cartographie combinée à la photométrie donne des résultats suffisants pour établir les caractéristiques principales de la séquence régionale, c'est-à-dire, début, durée, et fin de formation. D'un autre côté, les courbes de production neuro-nique précises exigent une analyse cellule par cellule et stade après stade ; aussi ce travail n'a-t-il été réalisé que pour le néocortex. Pour les autres structures, seule une appréciation globale sur l'allure de la courbe a été donnée, après des comptages cellule par cellule portant sur un nombre limité de stades et de niveaux.

Les lois de stratification sont plus simples à établir. En effet, de la même façon que la datation stratigraphique de couches géologiques étendues peut se faire à partir de quelques sondages, il est possible de dater les couches cellulaires à partir de comptages précis effectués selon quelques axes de scanning soigneusement choisis. Encore faut-il, pour généraliser une "datation", savoir à quoi correspond une couche chronologiquement homogène. Nous constaterons qu'elle ne correspond jamais à la notion classique de couche ou de "lamination" de l'anatomie microscopique pour la simple raison qu'il n'existe pas véritablement de couches chronologiques homogènes. Dans le cas le plus favorable, on décèlera à un niveau déterminé un maximum de cellules appartenant

à une génération, mais parmi elles se trouveront toujours des cellules appartenant à des générations plus anciennes ou plus récentes. Il n'existera donc pas de frontière précise entre les diverses générations cellulaires, et la notion de couche chronologique devra être remplacée par une conception moins déterministe : celle d'un maximum probable de densité pour les cellules d'une même génération. Les maximums de densité s'aligneront pour former une crête, dont la trace sur le plan de coupe sera nommée courbe isochrone. Ces courbes isochrones possèdent une correspondance objective en macro-radioautographie au ^{14}C . En effet, on distingue parfaitement sur de tels radioautogrammes les bandes foncées qui correspondent au maximum de concentration de la radioactivité. En fait, si le noircissement est bien proportionnel à celle-ci, il dépend aussi de la densité cellulaire. Il en résulte que, dans certains cas, une région à haute densité de cellules de la 2^e ou 3^e génération pourra apparaître marquée autant si ce n'est plus qu'une région à faible densité de cellules de la génération contemporaine de l'injection. L'analyse quantitative fine demeure donc indispensable pour la détermination des points maximums de densité des cellules d'une même génération, mais les radioautographies au ^{14}C restent très précieuses pour tracer les courbes isochrones à partir de ces points.

En résumé. Dans un premier temps, la cartographie et la photométrie combinées ont permis de définir les séquences régionales en procédant à la comparaison de mêmes niveaux marqués à des stades prénataux successifs. Dans une seconde phase, l'analyse quantitative a été pratiquée sur l'ensemble du SNC pour établir le tracé des lignes isochrones. L'étude a été tout particulièrement poussée pour certaines régions, ce qui a permis entre autres de tester la validité des lois théoriques établies au préalable (cf. Ch. III).

RESULTATS

A/ Télencéphale :

1/ Isocortex :

L'isocortex (VOGT, 1919), encore nommé cortex completus (FILIMONOFF, 1947), dérive du néopallium. Il est caractérisé par la présence de 6 couches de neurones. A la suite des observations de TILNEY (1933), il fut admis que ces neurones se rangeaient dans le cortex par ordre d'arrivée, les plus anciens près de la surface et les plus récents près du corps calleux. TILNEY distinguait chez le Rat trois vagues cellulaires successives : la première (du 16^e au 17^e jour) donnant les neurones des couches II et III, la seconde (émise du 18 au 19^e) formant la couche IV ; enfin, la dernière vague (du 20^e au 21^e jour) équipait les couches V et VI. En 1961, ANGEVINE et SIDMAN, après marquage à la thymidine tritiée, décrivaient chez la Souris un gradient rigoureusement opposé à celui décrit par TILNEY, les cellules les plus anciennes demeurant dans les couches les plus profondes. HICKS et al. (1959, 1961) puis BERRY et EAYRS (1963), parvenaient aux mêmes conclusions en étudiant l'action tératogène des rayons X sur le cortex en cours de développement. En associant les deux techniques, BERRY et al. (1964, 1965, 1966) précisèrent l'histogenèse du cortex chez le Rat et conclurent à l'existence de 3 vagues se succédant du 16^e jour de gestation jusqu'à la naissance. HICKS et D'AMATO (1968) étudièrent alors les processus de migration qui précèdent la formation du néocortex du Rat, en y incorporant des observations sur la chronologie comparée de quelques régions corticales. Aucun travail contemporain n'a cependant abouti à une systématisation intéressant l'ensemble de l'isocortex.

Quant à l'assertion selon laquelle les neurones seraient émis par vagues et s'accumuleraient en couches, elle ne résulte pas d'une analyse détaillée et n'est probablement qu'une image choisie par analogie avec les particularités cytoarchitectoniques de l'isocortex. Il était donc justifié de la reconsidérer.

a/ La séquence corticale par rapport aux autres structures :

La région choisie pour l'étude quantitative détaillée a été le néocortex antérieur, dans sa partie latéro-dorsale (région MM', LL' de SUGITA, 1917 , J de DROOGLEEVER-FORTUYN, 1914, et parietalis de BRODMANN, 1909).

On constate que les animaux injectés précocement (11,5 et 12,5 jours) présentent un marquage généralisé à l'ensemble des structures et, en particulier, au néocortex (Pl. 5, 6 et 25). Cependant, à ces stades, les cellules possédant les plus fortes densités en grains d'argent (200) ne s'observent jamais dans cette dernière région. Les pourcentages de cellules marquées oscillent autour de 50 % (52 % au maximum) pour l'ensemble des structures, sauf quelques exceptions. La moyenne des grains est élevée dans certaines régions comme l'amygdale (15,2), l'hypothalamus antérieur (16,5) ; elle tombe à 10 pour le néocortex profond et à 3,5 pour le néocortex superficiel. Tous les histogrammes présentent une forme étalée caractéristique (Pl. IV A) qui démontre que toutes les régions sont postérieures à l'injection et comprennent plusieurs générations cellulaires. On se trouve devant le cas 1 (paragraphe B, chapitre III). L'application des formules conduit aux résultats suivants : le cortex latéral profond (couche VI) débiterait environ 3 cycles après l'injection. En estimant la durée du cycle à 13 heures (chapitre II), ceci conduirait à situer le début de la formation vers 13 jours. La moyenne

PLANCHE IV A

HISTOGRAMMES GLOBAUX.

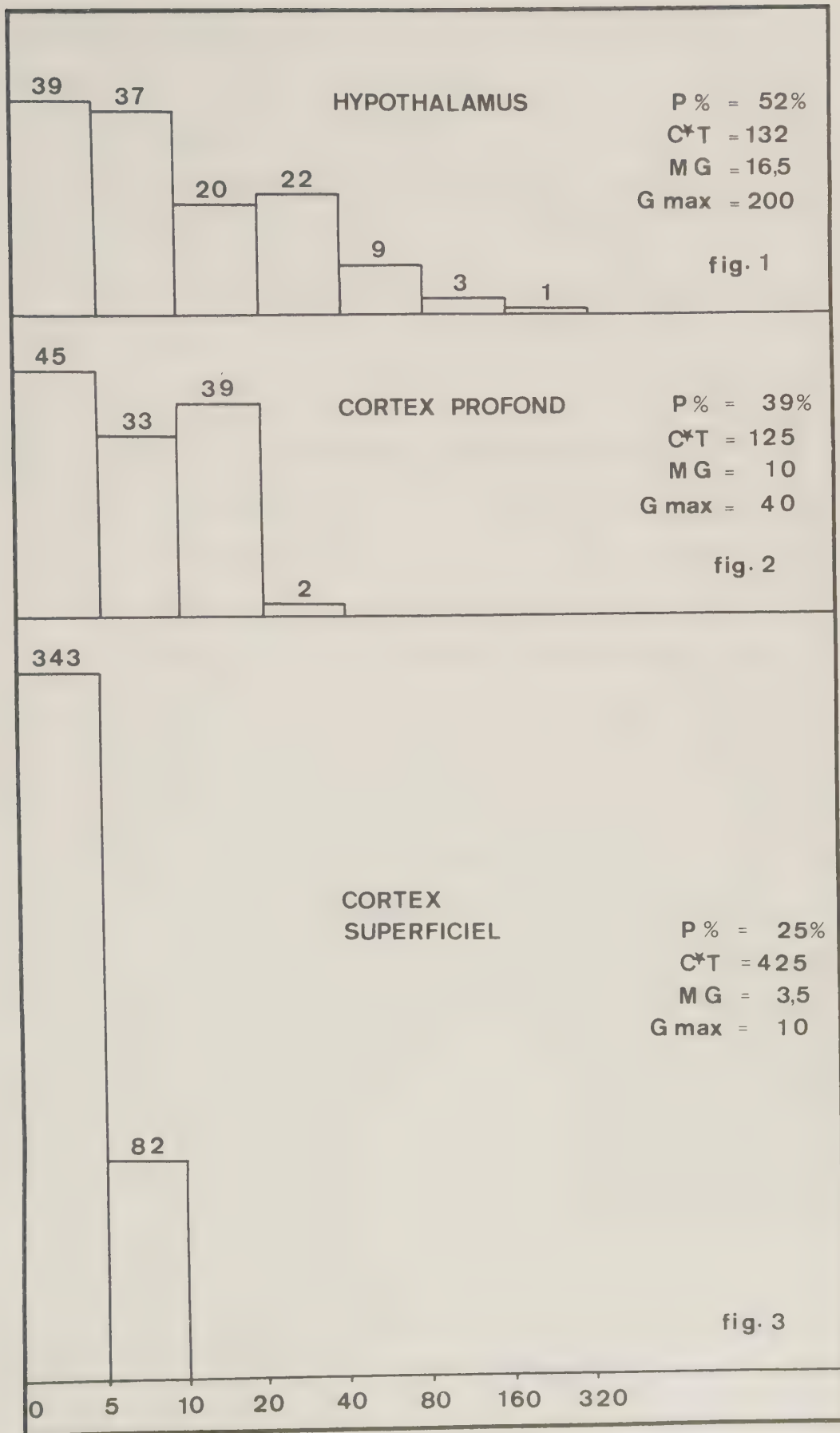
Marquage flash prénatal précoce (Stade 11,5 j).

Fig. 1 : hypothalamus : niveau transversal médian.

Fig 2 : cortex profond.

Fig 3 : cortex superficiel.

PL IV.A



des grains très basse de la couche corticale superficielle (couches II + III) indique que la totalité du cortex comporte environ 8 générations cellulaires. A titre de comparaison, nous avons placé sur la même planche (Pl. IV A, fig. 1) les résultats obtenus pour l'hypothalamus. On remarquera que cette structure, qui possède des cellules marquées au maximum, débute sa différenciation peu après l'injection, tandis que sa formation s'étale sur 6 cycles soit environ 3,3 jours.

Si l'injection est pratiquée à 14,7 jours, les histogrammes varient beaucoup. A côté d'histogrammes du même type que les précédents, on trouve des formes qui se rapprochent de l'histogramme "semi-poissonnien" de base. Le néocortex latéro-dorsal (Pl. IV B, fig. 1) qui a commencé son équipement neuronique depuis 1,5 jour, révèle des histogrammes aussi variés (Pl. IV B). Dans les couches V et VI, l'histogramme n'est pas tassé vers l'origine ; la moyenne des grains est maximale, avec un pourcentage peu élevé (Pl. IV B, fig. 2). Il s'agit donc d'une région dont une partie des neurones est antérieure à l'injection. Elle n'est pas parfaitement pure et l'on peut calculer qu'il y existe au moins 2 générations postérieures à l'injection. La région intermédiaire du cortex présente des caractères analogues, mais on y décèle la présence de 3 générations cellulaires (Pl. IV B, fig. 3). Les couches superficielles enfin sont totalement postérieures à l'injection (Pl. IV B, fig. 4). Le pourcentage des cellules marquées, après avoir subi une élévation dans les couches moyennes, décroît au niveau des couches superficielles. Cette décroissance est à mettre en parallèle avec la baisse de la moyenne des grains. Ce fait indique qu'un certain nombre de cellules ne sont plus comptées comme marquées, par suite de la dilution de leur ADN tritié. Il est remarquable de constater qu'aucun des histogrammes présentés ne montre une distribution proche de celle de l'histogramme "semi-poissonnien" de base ; cette constatation

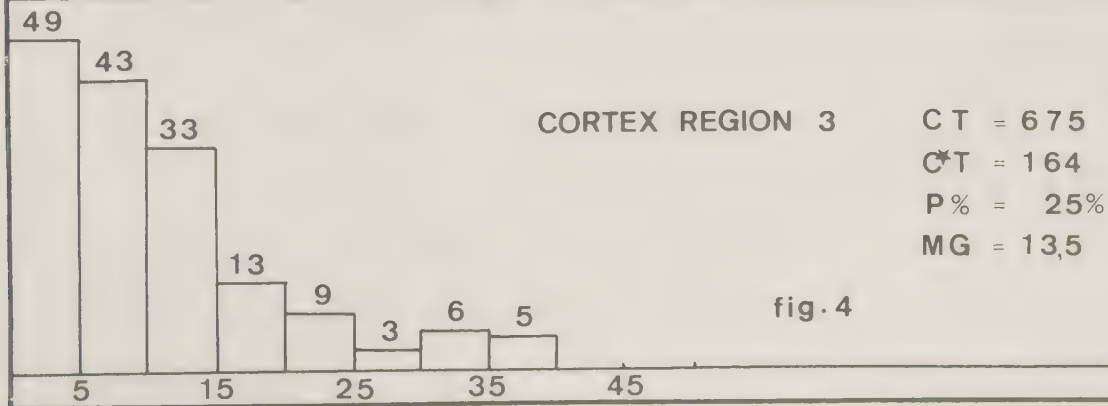
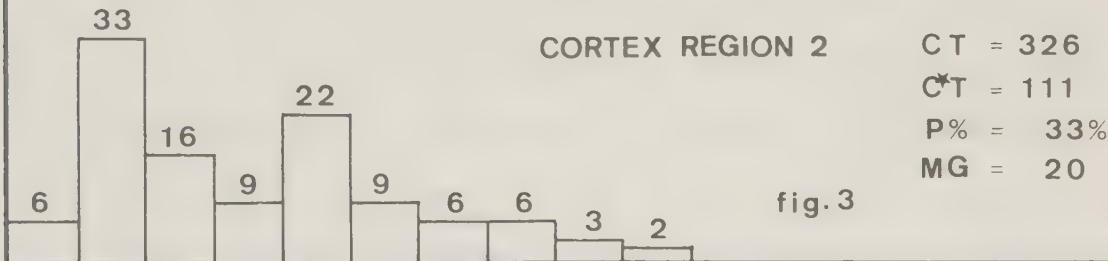
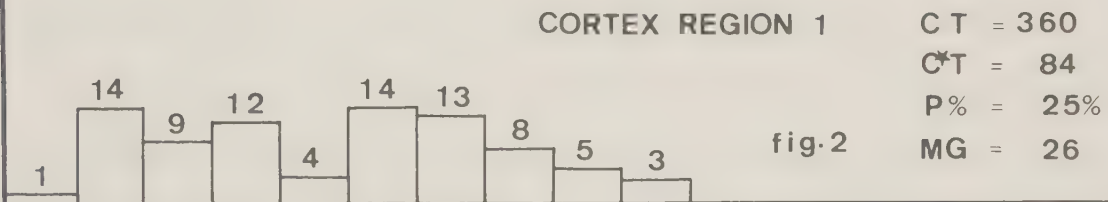
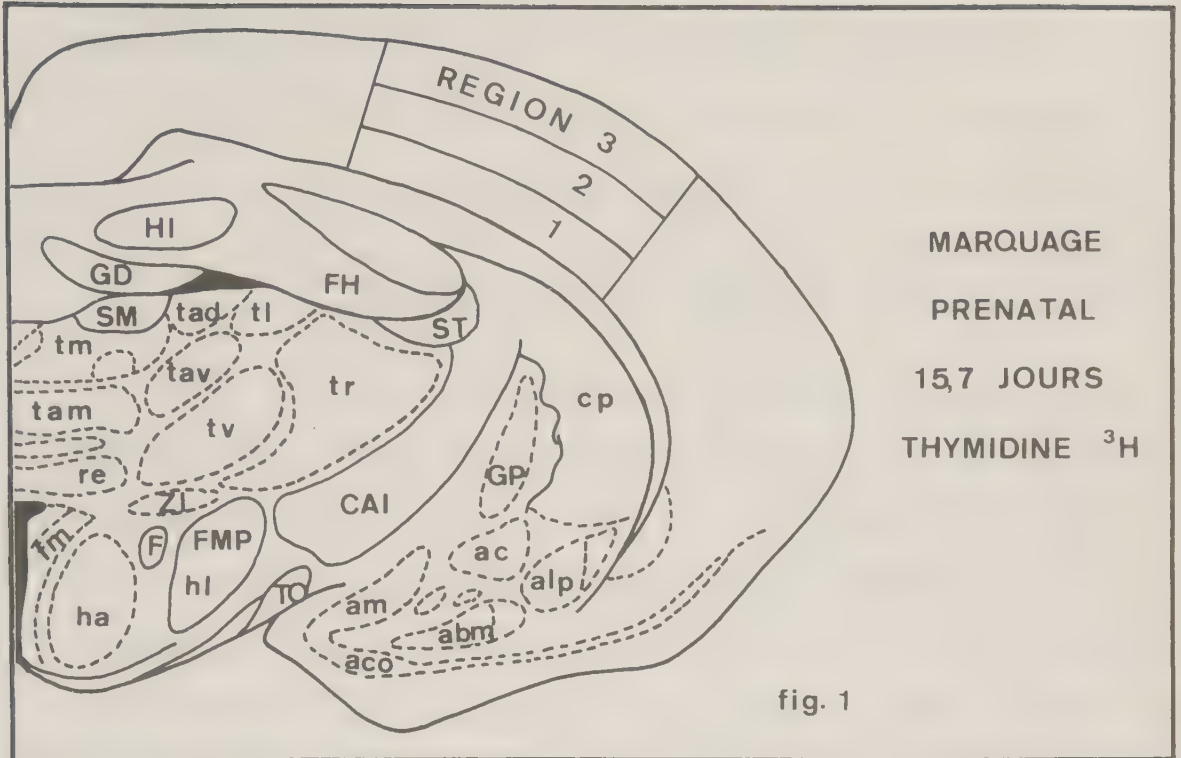
PLANCHE IV B

HISTOGRAMMES GLOBAUX ISOCORTICAUX.

Fig. 1 : schéma des régions corticales analysées.

Fig. 2, 3, 4 : histogrammes des régions 1,2 et 3.

PL IV.B



est généralisable à l'ensemble du SNC adulte. Ceci est un premier indice du haut degré d'interpénétration des différentes générations cellulaires pour l'ensemble du SNC en général et pour le néocortex en particulier.

b/ Lois de stratification :

- Evolution topographique du P% et de MG (Pl. IV C)

Elle a été suivie pour différents stades, selon un axe de comptage corps calleux-surface corticale. Chaque point de mesure représente la moyenne de 6 à 11 champs suivant les cas (objectif 75 ou 100, oculaire 8 x). Un contrôle cartographique de l'échantillonnage a été fait afin que l'ensemble des champs choisis pour la définition d'un seul point de mesure soit disposé de façon concentrique par rapport au corps calleux, donc normale à l'axe de comptage. L'erreur standard a été calculée pour un coefficient de sécurité de 95 %. Trois types de résultats se dégagent :

- . A 12,5 jours : le niveau de départ des 2 paramètres est bas et on observe ensuite une lente décroissance des 2 courbes (Pl. IV C, fig. 1).
- . A 13,5 jours : le pourcentage et la moyenne des grains partent de niveaux élevés, qui correspondent aux maximums généralement observés à ce stade. Le pourcentage décroît lentement puis plus rapidement. A l'inverse, la moyenne des grains s'effondre, puis diminue plus lentement (Pl. IV C, fig. 2).
- . A 15,5 jours et 16,5 jours : on observe une stabilité relative de la moyenne des grains, puis sa décroissance, tandis qu'à une montée du pourcentage succède sa diminution (Pl. IV C, fig. 3 et 4).

Ces résultats correspondent respectivement aux trois cas fondamentaux que nous avons distingué dans le chapitre III :

1°/ Régions à plusieurs générations dont le début de formation est postérieur à l'injection.

PLANCHE IV C

EVOLUTION DU POURCENTAGE DES CELLULES MARQUEES (P%) ET DE LA MOYENNE DES GRAINS (MG) A TRAVERS L'ISOCÔRTEX LATERO-DORSAL.

En abscisse : position par rapport à l'épaisseur du cortex (à gauche le corps calleux, à droite la couche I).

En ordonnées : les valeurs de P% et MG sont en unités arbitraires constantes pour toutes les figures.

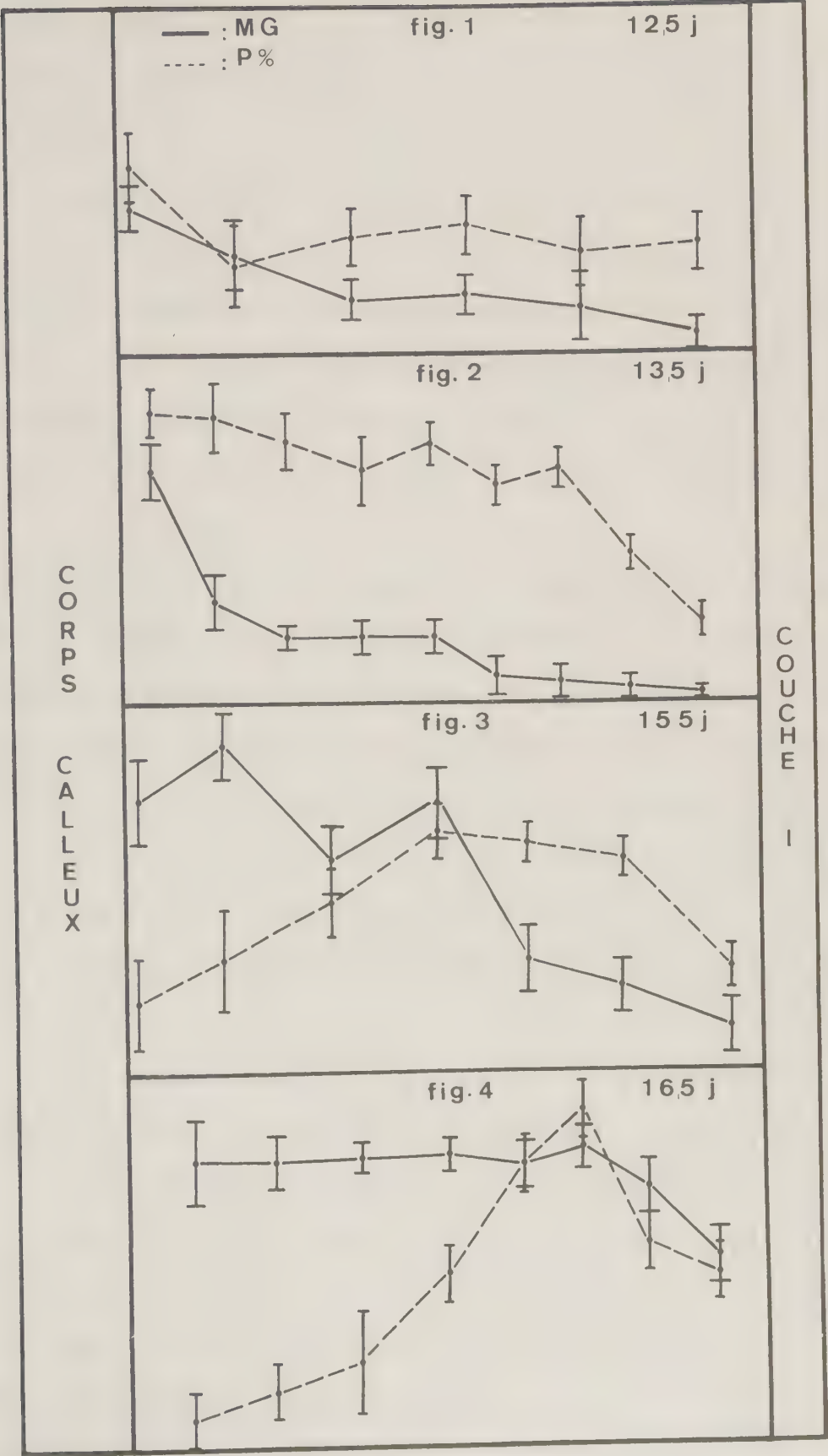
Fig. 1 : Injection au stade 12,5

Fig. 2 : Injection au stade 13,5

Fig. 3 : Injection au stade 15,5

Fig. 4 : Injection au stade 16,5

PL IV.C



2°/ Régions à plusieurs générations dont le début de formation est contemporaine de l'injection.

3°/ Régions à plusieurs générations dont le début de formation est antérieur à l'injection.

Comme l'a montré l'étude théorique, la forme des courbes obtenues à 15,5 et 16,5 jours indique que la stratification dans le cortex s'opère avec une interpénétration profonde des générations cellulaires (Pl. III G et Pl. IV C, fig. 3 et 4). Ainsi, dans le cortex le plus profond, à côté d'une majorité de cellules différenciées vers 14 jours, on trouve environ 35 % de cellules plus jeunes (20 % pour 15,5 j ; 10 % pour 16,5 j et 5 % pour 17,5 j et au delà).

Des proportions identiques se retrouvent pour les niveaux supérieurs jusqu'à 16,5 jours environ. Au-delà, le phénomène est topographiquement beaucoup moins étendu, ce qui correspond probablement à une diminution rapide de la production neuronique. A ces stades, l'intervalle compris entre l'isochrone 17,5 j et l'isochrone 20,5 j est entièrement contenu dans le diamètre du champ d'observation. Il n'est donc plus possible d'étudier comme précédemment les courbes d'évolution P% et MG.

- Courbes photométriques de densité après marquage à la thymidine ^{14}C :

Les courbes de densité photométrique obtenues par scanning transcortical coïncident avec les résultats précédents (Pl. IV D, a). Elles montrent que les répartitions observées pour 17,5 à 20,5 jours sont du même type que pour 14,5 ou 16,5 jours, mais avec des pics moins élevés. Un phénomène particulier apparaît sur les courbes 14,5 j et 15,5 j ; ces courbes sont bimodales et cette particularité -que l'on ne retrouve pas sur les courbes P% et MG précédentes- correspond très certainement à des variations de densité neuronique (cf. Discussion).

PLANCHE IV D

PHOTOMETRIE APRES MARQUAGE A LA THYMIDINE ^{14}C .

- a. Courbes photométriques de densité de marquage après injection prénatale de thymidine ^{14}C . Mêmes remarques que pour la planche précédente (Pl. IV C) en ce qui concerne les coordonnées et les unités.
- b. Echelle chronoarchitectonique. Cette échelle (bas de la page) est établie à la fois par les données thymidine ^3H (résumées sur la Pl. IV C) et les données photométriques illustrées sur cette planche.

PL IV.D

DATE
D'INJECTION
THYMIDINE ^{14}C

135 j

145 j

155 j

165 j

175 j

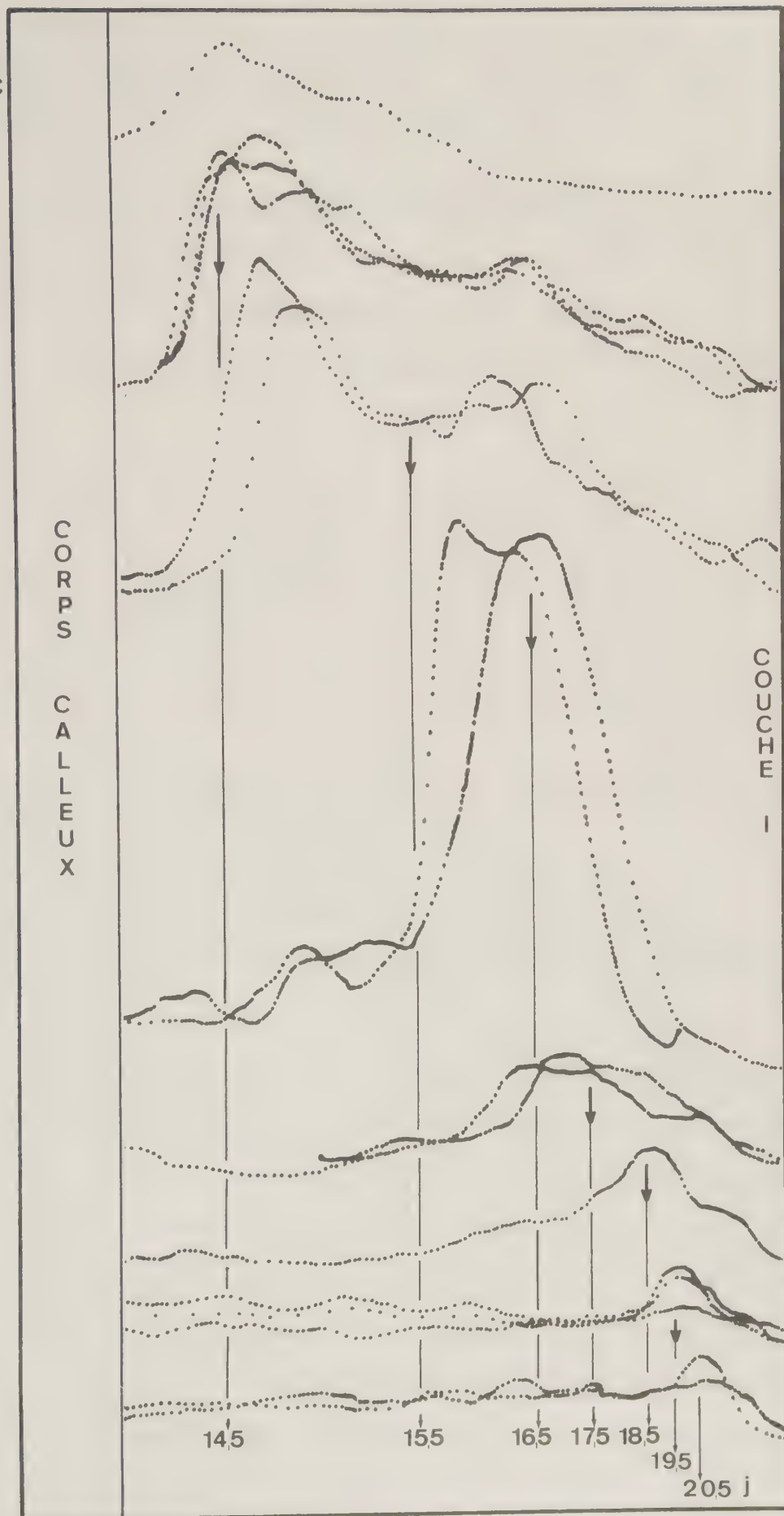
185 j

195 j

205 j

CORPS
CALLEUX

COUCHE I



Les lignes isochrones correspondant au maximum de densité d'une génération cellulaire déterminée ont été tracées en utilisant les résultats complémentaires obtenus par les deux méthodes (Pl. IV D, b).

- Relations chronologiques et architectoniques :

Comme le montre la planche IV-E, dans le secteur isocortical choisi, il est possible de mettre en correspondance les lignes isochrones (fig. 4) avec les couches histologiques corticales (fig. 1). Il en découle les observations suivantes :

Couche VI : elle est composée de neurones de 13,5 - 14,5 et 15,5 jours et d'environ 15 % de neurones encore plus récents.

Couche V : elle est essentiellement formée de neurones de 15,5 et 16,5 jours et d'une petite proportion de neurones de 14,5 et 17,5 jours.

Couche IV : la majorité de neurones est de 16,5 jours avec une petite proportion de neurones de 15,5 et 17,5 jours.

Couche III : la majorité des neurones est formée vers 18,5 et 19,5 jours et une faible proportion au stade 20,5.

Couche II : une majorité de neurones de 20,5 jours.

Couche I : pas de résultats quantitatifs en raison du faible nombre des neurones.

Compte tenu de la répartition transcorticale du pourcentage des neurones on peut remarquer que le taux de production des neuroblastes n'est pas constant. Les isochrones, d'abord espacés entre 13,5 et 17,5, se resserrent au-delà de 17,5 jours beaucoup plus que l'augmentation de densité des neurones ne le requiert. Ce fait est encore plus évident si l'on représente la densité neuronique en pourcentages cumulés, du corps calleux vers la couche I (Pl. IV E, fig. 3). De cette répartition, on peut déduire que le taux de production neuroblastique évolue suivant une courbe dont le maximum est situé vers 15,5 jours. L'augmentation de

PLANCHE IV E

RESULTATS CYTOMETRIQUES DANS LE CORTEX LATERO-DORSAL.

Fig. 1 : Schéma montrant à l'échelle la répartition des couches dans le secteur isocortical choisi (SUGITA, 1917).

Fig. 2 : Evaluation en pourcentage de la densité neuronique générale dans la direction corps-calleux-couche I (sans correction de comptage). Comptage des neurones sur des coupes histologiques colorées au violet de crésyl.

Fig. 3 : Pourcentages cumulés de ces résultats.

Fig. 4 : L'échelle chronoarchitectonique placée en correspondance de l'histogramme précédent (fig. 3) permet d'évaluer le taux de production des neurones en fonction du temps (la notation 100 % - X de la figure 3 est utilisée pour rappeler qu'un certain nombre de neurones pourraient avoir une origine post-natale).

PL IV.E

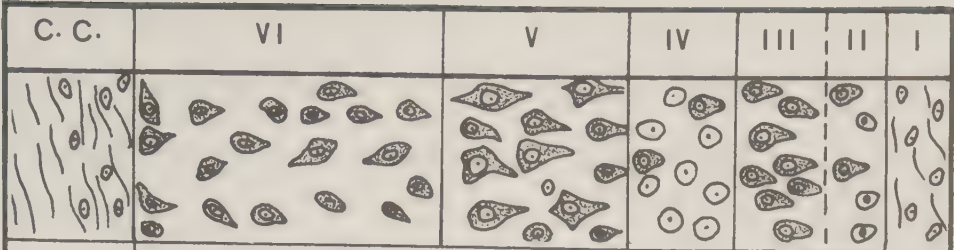


fig.1

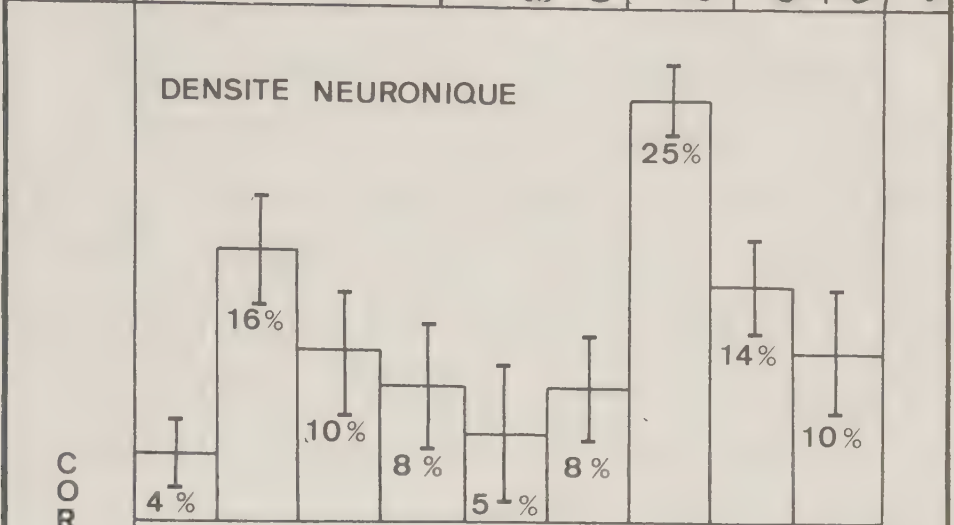


fig.2

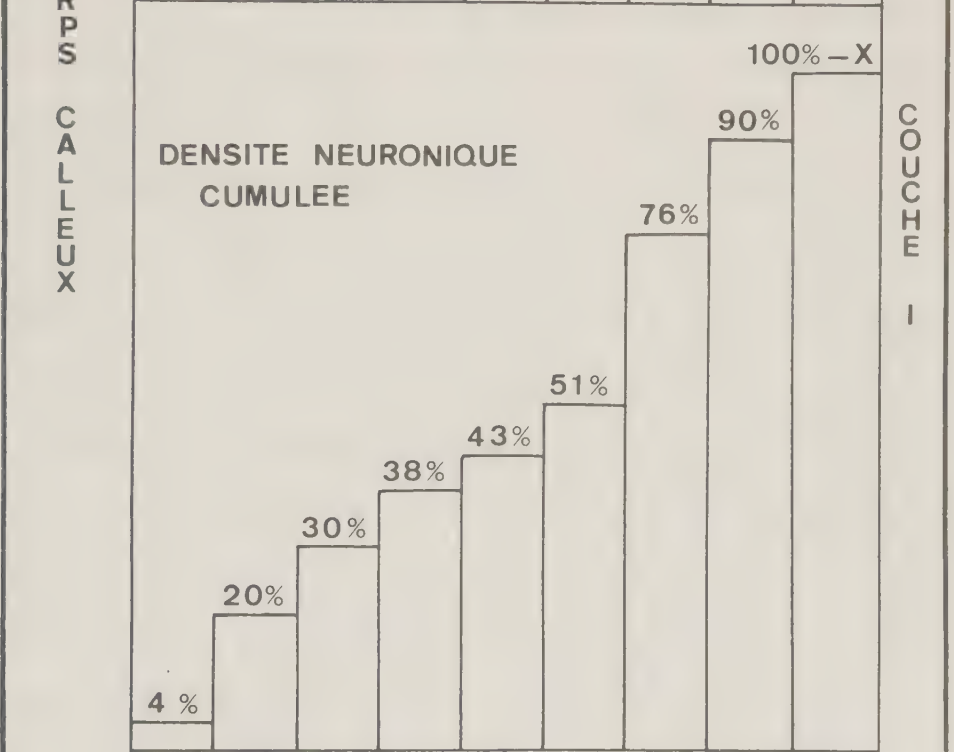


fig.3

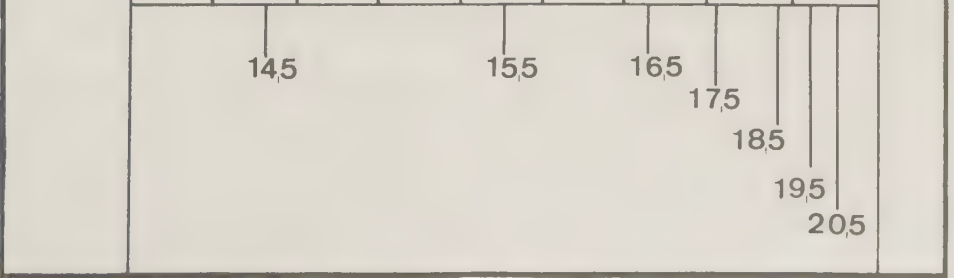


fig.4

ce taux est rapide au départ et 50 % des neurones corticaux sont déjà produits vers 15,5 j. La décroissance est ensuite approximativement exponentielle. Au-delà de 17,5 jours et jusqu'à la naissance, l'apport total en neurones ne sera que de 16 %.

- Résultats comparés pour l'ensemble de l'isocortex :

La région choisie pour l'étude quantitative est représentative de l'isocortex tel qu'il est classiquement défini ; on y trouve en particulier les 6 couches classiques. Cependant, sur le plan chronoarchitectonique, il est intermédiaire aux zones isocorticales qui le bordent de part et d'autre. En effet, il est facile de constater (cf. Thèse 2^e partie) que le passage entre l'isocortex le plus ancien, situé latéralement et les zones dorsales récentes se fait très progressivement, sans qu'il soit possible de déceler la moindre frontière. En revanche, la séparation entre l'isocortex et l'allocortex paléopallial piriforme est bien marquée par la scissure rhinale. Cette scissure se présente comme une barrière infranchissable pour les couches isocorticales récentes (16,5 j et au delà). *La région latéro-inférieure* correspond partiellement à l'aire insulaire de BRODMANN ou aire de H de DROOGLEEVER-FORTUYN (MM'-OO' de SUGITA). On y trouve les neurones isocorticaux les plus anciens (13,5 j), et même 12,5 j, ces derniers étant rattachés au claustrum. Tout près de la scissure rhinale, l'épaisseur de la zone à 13,5 j est considérable et constitue les 3/4 de l'épaisseur du cortex, c'est-à-dire les couches VI, V, IV et une partie de III. Au-dessus, on trouve des neurones à 14,5 puis 15,5 et 16,5 jours. Moins de 10 % des neurones les plus superficiels (couche II) sont postérieurs à 16,5 j sans qu'aucun soit postérieur à 18,5 jours. Longitudinalement, on remarque que cette zone isocorticale varie légèrement. Antérieurement au niveau décrit, l'épaisseur atteinte par les neurones de 13,5 j est considérable (4/5 du cortex). Postérieurement, dans la région occipitale, les apports récents sont organisés comme aux niveaux précédents,

mais les neurones anciens (12,5 à 13,5 j) n'occupent que la moitié du cortex. En résumé, il n'y a pas de différence dans le sens antéro-postérieur pour les couches les plus récentes de l'isocortex péri-rhinal ; alors qu'il existe de grandes variations pour le "noyau" ancien, très épais au niveau moyen-antérieur et qui s'amincit de part et d'autre et surtout en direction occipitale.

Dans tous les cas, nous avons trouvé un taux de mélange élevé pour les différentes couches et, comme pour la région latéro-dorsale, une "colonisation" des couches anciennes (13,5 j) par des neurones d'âge moyen (14,5 j ; 15,5 j) et récents (16,5 j). Comme nous l'avons déjà noté, le phénomène s'atténue au fur et à mesure que l'on s'approche de la surface.

Dans la région dorsale (LL', KK' de SUGITA ; f de DROOGLEEVER-FORTUYN, praecentralis de BRODMANN), on note la disparition du "noyau ancien" (12,5 j ; 13,5 j) ; néanmoins, les isochrones 14,5 j et au-delà sont en continuité avec ceux de la région latéro-dorsale avec les mêmes caractéristiques de mélange. Longitudinalement, on n'observe pas de variations importantes, sauf aux deux extrémités. Au pôle frontal, on note la disparition des isochrones récents (18,5 j). Au pôle occipital au contraire, on constate une baisse nette des taux de mélange, la stratification chronologique étant particulièrement contrastée entre les isochrones récents et moyens. En effet, les cellules récentes de 16,5 j à 20,5 j s'accumulent en une mince bande qui correspond à peu près aux couches II et III (Région WW' de SUGITA). A l'opposé, les couches moyennes (15,5 j et 14,5 j) occupent les 3/4 du cortex et surmontent une couche ancienne résurgant à ce niveau (13,5 j). On doit noter dans cette région la présence inattendue d'une pellicule de neurones récents et très récents (de 17 j à 20,5 j) entre le ventricule et l'isochrone 13,5 j.

Le cortex interhémisphérique (HH', GG' de SUGITA ; C de DROOGLEEVER-FORTUYN ; cingularis de BRODMANN) montre un double appauvrissement. Les neurones

anciens n'y existent plus et, à la base (couches VI et V), on ne trouve que des neurones d'âge moyen (14,5 et surtout 15,5 j). En surface, les neurones récents sont proportionnellement moins nombreux, et on constate même, dans le plan antérieur, la disparition des plus récents d'entre eux (au-delà de 18,5 j).

2/ Allocortex

Par opposition à l'isocortex (VOGT, 1919), typiquement hexalaminé, on distingue l'allocortex qui est de type archipallial (archicortex de FILIMONOFF, 1947) ou paléopallial (paléocortex). En radioautographie, il n'existe aucun travail sur ces structures chez le Rat. Chez la Souris, ANGEVINE (1965) a étudié en détail la région hippocampique, tandis qu'HINDS et ANGEVINE publiaient en 1965 une note brève sur l'aire piriforme chez le même animal.

a/ Paléocortex

Occupant pratiquement toute la base du télencéphale, il est séparé de l'isocortex par la scissure rhinale. Il peut être divisé en plusieurs champs, dont la nomenclature varie considérablement selon les auteurs. Principalement constitué par le lobe prépiriforme, il est bordé antérieurement et latéralement par l'aire piriforme, ainsi que par le tubercule olfactif plus médialement (ALLISON, 1953) et le cortex basal plus caudalement (KUHLENBECK et al., 1954 c, 1960). La partie postérieure est individualisée sous le nom de cortex entorhinal (M. ROSE, 1929). Certains auteurs comme HUMPHREY (1940) et FEREMUSTCH (1952) incluent le bulbe olfactif dans le paléocortex. Enfin on distingue parfois un cortex intermédiaire transitionnel entre le paléocortex et le néocortex (péri-semi-cortex de FILIMONOFF et mésocortex de M. ROSE).

. Le pédoncule olfactif : ventralement, la région du pédoncule olfactif sert de jonction entre le bulbe olfactif et les hémisphères. Chez le Rat, ce pédoncule massif contient l'aire olfactive secondaire, représentée par le noyau olfactif

antérieur (HERRICK, 1910). Ce noyau se subdivise (GURDJIAN, 1925 ; ARIËNS-KAPPERS et al., 1936) en une partie latérale en relation avec le cortex piriforme, une partie dorsale qui s'étend sur le ventricule, une partie latéro-ventrale, enfin une partie postérieure qui s'étend de la partie latéro-ventrale jusqu'au tubercule olfactif. La partie médiane est le résultat de la fusion des parties dorsale et supérieure. Enfin, la partie externe s'étend caudalement contre la surface interne du tractus olfactif latéral. Entre ces formations et le plan sagittal interhémisphérique, on trouve des couches stratifiées dont la structure est typiquement celle du bulbe olfactif. De l'extérieur vers l'intérieur, on distingue la plupart des couches typiques du bulbe (CAJAL, 1911) : la couche glomérulaire qui contient, outre les glomérules olfactifs, des cellules granulaires (LGE), la couche moléculaire, puis la couche plexiforme interne, la couche des cellules mitrales et enfin la couche granulaire interne (LGI). Antérieurement le bulbe olfactif accessoire s'intercale entre le pôle frontal et le pédoncule olfactif. En relation avec le nerf de Jacobson (voméronasal), il présente une structure très comparable à celle du bulbe proprement dit, mais serait phylogénétiquement plus archaïque que lui (PAPEZ, 1929). En radioautographie, le seul travail voisin du nôtre est celui de HINDS (1968). Il est consacré au bulbe olfactif de la Souris ; sans référence aux noyaux olfactifs, il s'attache à démontrer la relation qui existe entre l'âge de différenciation des neurones et leur taille définitive.

Sur les radioautogrammes observés à l'âge adulte, les premiers neurones marqués apparaissent lorsque l'injection a été pratiquée au stade prénatal 11,5, au-dessus de la partie externe du noyau olfactif. Il s'agit des neurones triangulaires ou étoilés de CAJAL et des grosses cellules appartenant au bulbe accessoire. Leur production va se poursuivre dans cette région jusqu'à 14,5 j. Les cellules mitrales du bulbe olfactif proprement dit apparaissent un peu plus tard

(12,5 j) et sont émises jusqu'à 15,5 j. Succédant aux cellules moyennes du bulbe accessoire, la couche des grains de cette structure apparaît marquée dès 14,5 j et jusqu'à 16,5 j ; au-delà, un léger marquage persiste, surtout localisé à la couche superficielle des grains. Il en est autrement pour les grains du bulbe. Ils apparaissent marqués vers 16,5-17,5 j et leur production persiste jusqu'à la naissance et au-delà dans LGE et LGI. Quant aux autres neurones du bulbe (cellules à panache de CAJAL), leur production s'étale de 11,5 j jusqu'à peu avant la naissance. Quant au noyau olfactif proprement dit, on peut y distinguer quelques neurones marqués vers 12,5-13,5 j ; surtout dans sa partie externe. Vers 14,5 j, le marquage atteint l'ensemble des couches les plus externes. Vers 17,5 j il concerne leurs couches les plus profondes et cesse ensuite totalement. *A un niveau plus postérieur (Pl. 89 niveau II), le noyau olfactif est composé essentiellement de neurones de 14,5 j.*

Si les observations radioautographiques sont pratiquées à la naissance, les résultats diffèrent. Pour les stades marqués précocement (10,5 ; 11,5 ; 12,5 et 13,5 j), il est intéressant de constater que seules les cellules du bulbe olfactif accessoire sont en place et dessinent une mince bande intensément marquée entre le pôle frontal et le bulbe olfactif. Ailleurs, le marquage est diffus et discret. Vers 14,5 j, une auréole de cellules marquées entoure la totalité du bulbe principal, sauf sur sa face interne. Progressivement, l'auréole se renforce vers la face interne ainsi qu'en direction centripète. Peu de temps avant la naissance, le marquage est central et coïncide avec la zone ventriculaire et sub-ventriculaire.

. Le tubercule olfactif : c'est la différenciation caudale du noyau olfactif antérieur. Son état de développement est en rapport avec l'importance du système olfactif de l'animal. Il est bien développé chez le Rat (GURDJIAN, 1925). Sa structure est extrêmement variable d'un point à un autre. Classiquement, on y

distingue 3 niveaux (CAJAL, 1911) : antérieurement, une zone où 3 couches s'individualisent nettement en une couche plexiforme, une couche de cellules pyramidales et une couche de cellules polymorphes. Au niveau moyen à ces 3 couches, s'ajoutent des amas de petits neurones (grains). Postérieurement, la région ne présente aucune stratification nette, bien que les différences cytoarchitectoniques subsistent. Les planches 89 et 90 (aux niveaux II et III) représentent le tubercule olfactif à un niveau intermédiaire.

Les cellules pyramidales moyennes, qui constituent la couche la plus dense, se différencient rapidement et d'une manière relativement homogène entre 14,5 et 15,5 j. On note toutefois que la partie corticale est légèrement plus ancienne ventralement que latéralement. Les cellules polymorphes, constituant une couche plus interne, se différencient légèrement plus tôt que les précédentes, dès 12,5 j pour certaines, mais en général le 13,5^e j. Quant aux ilots de CALLEJA, formés par des amas de petits neurones, ils sont composés de cellules très récentes et leur début de différenciation varie de 16,5 j pour les plus latéraux et se poursuit jusqu'à 18,5 j pour les ilots situés près de la scissure interhémisphérique.

L'analyse des radioautogrammes peu après la naissance ne révèle pratiquement pas de différence avec les coupes de cerveaux adultes, sauf en ce qui concerne les ilots de CALLEJA dont les cellules ne semblent pas encore regroupées à ces stades.

. Cortex piriforme, prépiriforme et entorhinal. On distingue généralement 3 couches dans ce paléocortex : une couche profonde de grandes pyramides, une couche moyenne de pyramides de toutes tailles serrées en une mince bande, enfin une couche plexiforme externe. La transition avec le tubercule olfactif est assurée par l'aire subpiriforme. Vers l'amygdale et la scissure endorhinale, les couches 2 et 3 sont fusionnées, tandis que postérieurement on trouve 4 couches au lieu de 3.

L'homogénéité chronologique de ces zones est élevée. La séquence constitutive y est comparable à celle du tubercule olfactif. Les cellules les plus profondes sont en général du stade 12,5 ; elles occupent les 3/4 de l'épaisseur du cortex dans la région antérieure (prépiriforme). Dans cette couche, caractérisée comme toutes les régions anciennes par un taux de mélange élevé, on trouve aussi des cellules de 13,5 j en nombre important. La bande de cellules denses, bien marquée au niveau rostral, est composée de cellules de 13,5 puis 14,5 et 15,5 j et enfin 16,5 j près de la surface (peu de neurones pour cette dernière catégorie). Cette disposition se retrouve à tous les niveaux ; cependant, on constate que les proportions de neurones des différentes générations varient progressivement. En effet, plus on s'éloigne en direction caudale, plus les couches anciennes perdent de leur importance relative. Ainsi, dans le cortex entorhinal, la surface isochronique 13,5 occupe de la moitié au tiers de l'épaisseur totale. On constate parallèlement que le taux de mélange des différentes générations diminue, c'est-à-dire que la stratification chronologique s'accentue.

. Le cortex périamygdalien (3è partie du cortex basal de KUHLENBECK, 1960) est essentiellement constitué par le noyau cortical amygdalien. Son étude sera donc envisagée en même temps que l'archistriatum.

b/ Archicortex :

L'allocortex est typiquement caractérisé par la présence de couches cellulaires particulières. La plus superficielle est la couche plexiforme. Elle surmonte une couche de cellules pyramidales qui, souvent, est comprise entre la précédente et une couche de cellules polymorphes. Si ce modèle fondamental n'est pas la règle dans le paléocortex, il est en revanche constant dans l'archicortex. Celui-ci comprend chez le Rat, une partie péricommissurale, vestigiale, et le limbe hippocampique bien développé. On y distingue la corne

d'Ammon, le subiculum, le gyrus dentatus et le limbe retrohippocampique comprenant le présubiculum, l'aire rétrospléniale et le parasubiculum.

Les premières cellules marquées apparaissent pour une injection pratiquée à 13,5 j. Elles se localisent à la région subiculaire, dans la partie profonde de la couche des cellules polymorphes. Par la suite, les neurones marqués vont gagner les couches plus superficielles. Le maximum de production, observé à 15,5 j est suivi d'une décroissance rapide. Il n'existe que très peu de neurones postérieurs à 17,5 j. Dans la corne d'Ammon, ces caractéristiques sont peu modifiées. Cependant, le départ de la séquence est légèrement reculé par rapport au subiculum (14,5 j), l'achèvement de la couche pyramidale étant du même ordre (17,5 j ; 18,5 j). La partie la plus extrême (champ H3 de M. ROSE) de la couche pyramidale est également décalée par rapport à la précédente : départ vers 14,5 j et achèvement vers 17,5-18,5 j. Pour l'ensemble de la couche pyramidale, le maximum de production est observé vers 15,5-16,5 j. Alors que dans la région subiculaire le gradient interne-externe était aisé à mettre en évidence, dans la corne d'Ammon le tassement des cellules pyramidales le rend moins évident, mais il est toujours dirigé dans le même sens. Quant aux neurones, peu nombreux, disséminés en dehors du stratum pyramidal, leur production s'étale entre 13,5 et 15,5 j sans gradient apparent. Le comportement des neurones du gyrus dentatus est très différent de celui des neurones qui appartiennent à la corne d'Ammon ou au subiculum. Les premiers apparaissent dans la courbure interne du stratum granulosum pour une injection pratiquée à 16,5 j. A partir de 18,5 j, le marquage est généralisé à l'ensemble de la couche granulaire et il s'y maintiendra jusqu'à la naissance et même au-delà (ALTMAN, 1963, 1966). Les régions entorhinale (de type paléocortical) et présubiculaire sont caractérisées par la progressivité de la transition entre le cortex périrhinal et l'hippocampe. Plus on s'éloigne de l'hippocampe plus on trouve des neurones

anciens (12,5 j), localisés dans les couches profondes du gyrus parahippocampique. Parallèlement, en surface, il se produit une raréfaction des apports récents (cf. le paragraphe concernant le paléocortex). En suivant le limbe hippocampique longitudinalement tout au long de son enroulement, nous n'avons constaté aucune variation sensible des caractéristiques chronoarchitectoniques que nous venons de décrire.

3/ Striatum

VOGT (1920) nommait striatum l'ensemble caudatus-putamen qui se présente comme une formation indivise chez le Rat. Par analogie avec les subdivisions ontogénétiques et phylogénétiques du pallium, ARIËNS-KAPPERS (1923) le nomme néostriatum du fait de son développement récent par rapport aux autres formations striées. Dans ce contexte, le globus pallidus prend le nom de paléostriatum (pallidum de VOGT). On lui associe, chez le Rat, le noyau entopédonculaire. L'archistriatum est constitué par le complexe amygdalien. Le claustrum, formation dont l'origine est très discutée, prend place selon les auteurs dans le néocortex (BRODMANN, 1909), le striatum (MACCHI, 1951) ou constituerait une formation intermédiaire (FILIMONOFF, 1966).

a/ Néostriatum :

Les résultats chronoarchitectoniques confirment les différences évolutives entre pallidum et néostriatum. Ce dernier est en effet, dans son ensemble, plus récent, les neurones les plus anciens étant du stade 13,5 et même 12,5 j pour quelques rares cellules. En fait les premiers neurones à apparaître en proportion appréciable sont du stade 14,5. Ils se distribuent uniformément dans le noyau. Par la suite, les neurones des stades 15,5 et surtout 16,5 j se placeront préférentiellement vers la surface latéro-dorsale. Tardivement, on trouve encore quelques neurones marqués à 17,5 j en position très su-

perficielle. Il existe donc ici encore un gradient profondeur-surface, mais il est peu accentué, c'est-à-dire que l'importance du chevauchement entre les différentes générations y est très élevé, surtout en ce qui concerne les neurones d'âge moyen (13,5 - 14,5 et 15,5 j), qui forment un noyau compact, dépourvu de gradient apparent. Dans le sens longitudinal, on ne trouve pas de variation importante de ce pattern.

b/ Paléostriatum :

Le paléostriatum, plus ancien, est d'origine controversée comme nous le soulignerons dans la discussion. Il est constitué pour ses parties ventromédianes, par des neurones très anciens (11,5-12,5 j) suivis d'apports d'âge moyen (13,5 à 15,5 j) dans les régions latérales. On n'y trouve que très exceptionnellement des neurones plus récents. Il existe probablement un léger gradient en continuité avec celui du néostriatum sus-jacent, mais il est très difficile à déceler en raison du taux de mélange pratiquement maximum et de l'hétérogénéité histologique de ce noyau. Le maximum de production neuronique se situe vers 13 j et n'est pas très marqué, à l'inverse du néostriatum où un pic très net se dégageait vers 15,5 j. Cependant, on ne peut pas dire que cette séquence soit typiquement sous-thalamique ; elle est plutôt de type intermédiaire entre le néostriatum et les parties anciennes du diencephale. Le pallidum pourrait ainsi s'interpréter comme une structure de transition, dont les neurones constitutifs émaneraient de deux territoires distincts.

c/ Archistriatum :

Constitué essentiellement par le complexe amygdalien chez les Mammifères, il est divisé généralement en 3 régions (FOX, 1940) : le noyau antérieur, le groupe cortico-médian et la partie latéro-basale. On lui associe souvent le noyau de la strie terminale et, parfois, le claustrum. Le fait le plus marquant de ce complexe est l'existence d'un fort gradient rostro-caudal,

qui ne coïncide pas avec ses divisions classiques.

Antérieurement, on trouve 3 types de formation. L'aire amygdalienne antérieure se révèle comme une des structures les plus anciennes de tout le SNC ; elle voit la majorité de ses neurones se différencier entre 11,5 et 12,5 j, avec quelques neurones résiduels à 13,5 j. De son côté, le noyau du tractus olfactif latéral débute un peu plus tardivement, passe par un pic à 13 jours pour s'achever à 14,5 j. Enfin, une troisième division, la massa intercalata, peut être considérée comme la plus récente non seulement de ce niveau, mais aussi de tout le complexe archistrié. Débutant vers 14 j, son maximum se situe à 15,5 j mais, quelques neurones se marquent encore à 17,5 j. La haute densité cellulaire qui y règne ainsi que sa situation chronologiquement discordante par rapport aux structures environnantes rappellent fortement le cas des ilots de CALLEJA du tubercule olfactif, du gyrus dentatus ou encore des couches granulaires du bulbe olfactif.

Un peu plus postérieurement, on trouve encore 3 types de séquences. La plus "archaïque" concerne le noyau amygdalien cortical, le noyau du tractus olfactif latéral et le noyau médian. Le début de formation se produit toujours vers 11,5 j et la séquence est plus étalée que celle de l'aire amygdalienne antérieure (14 j). Deux noyaux débutent plus lentement à 11,5 j, et terminent leur séquence vers 15 j ; il s'agit du noyau central et de la partie antérieure du noyau latéral. Enfin, on retrouve la massa intercalata avec sa séquence particulière.

Au niveau moyen, les caractéristiques d'ensemble sont les mêmes que précédemment pour les noyaux amygdaliens cortical, médian, central et le noyau basal médian. Mais on constate que la séquence s'y décale légèrement par l'arrivée de contingents de neurones plus récents (de 14,5 à 15,5 j). Le phénomène est plus marqué pour le noyau central et le noyau médian. Pour la partie antérieure du noyau latéral, la séquence terminale est identique à celle de ces deux der-

niers noyaux, mais elle débute plus tardivement (12,5 au lieu de 11,5 j). Enfin à ce niveau, on trouve 2 noyaux relativement récents, puisque leur début de séquence se situe vers 13,5 j pour se terminer à 15,5 j. Il s'agit de la partie postérieure du noyau latéral et de la partie latérale du noyau basal.

Postérieurement, la situation change encore plus profondément. Il n'existe plus de neurones anciens (très peu à 12,5 j) et la quasi-totalité des neurones sont produits entre 14 et 15,5 j avec une production résiduelle à 16,5 j. Un léger gradient intérieur-extérieur est décelable pour le noyau cortical à ce niveau postérieur.

En résumé, on constate un gradient extrêmement accusé dans le sens rostro-caudal avec tous les intermédiaires entre une structure typiquement archaïque comme l'aire antérieure, qui possède une séquence courte à début précoce, et les noyaux postérieurs, qui possèdent une séquence plus longue et fortement décalée par rapport à la précédente. Pour un même niveau, on remarque des différences entre les noyaux, mais elles ne sont prononcées qu'au niveau moyen. Là, on constate que les noyaux latéraux et la partie latérale du noyau basal ont une séquence décalée et plus récente que celle des noyaux médians et basal. Quant au noyau cortical (cortex basal amygdalien de KUHLENBECK), il est de par sa structure allongée d'avant en arrière directement intéressé par le gradient ; aussi sa partie antérieure archaïque est-elle absolument différente de sa partie postérieure.

Le claustrum est parfois rattaché à l'archistriatum, HOLMGREN (1925) le fait d'ailleurs dériver avec le groupe amygdalien latéral d'une même formation, l'aire claustrale primitive. Beaucoup d'auteurs le considèrent comme une formation palliale (CAJAL, 1902 ; BRODMANN, 1909 ; ARIËNS-KAPPERS, 1921 ; SPATZ, 1921 ; LANDAU, 1923 ; M. ROSE, 1928) et, plus récemment, MACCHI (1951) n'avalisent pas ce point de vue et, dans l'ensemble, le considèrent comme une formation

de type archistriée. Chez le Rat, le claustrum n'est pas aussi bien individualisé que chez les Mammifères supérieurs, si sa séparation est nette avec le complexe putamino-caudé (capsule externe), il semble en continuité avec les couches profondes (VI) de l'isocortex et de l'allocortex périrhinal.

Sur le plan chronoarchitectonique, nous obtenons des résultats qui reflètent l'hétérogénéité de sa nature. Dans l'ensemble, c'est une structure ancienne qui ne montre pas de gradient dans la direction axiale du cerveau avec une séquence assez courte. Pour un marquage effectué vers 11,5 j, on trouve quelques neurones localisés à la partie profonde du claustrum, tout contre les fibres blanches de la capsule. A 12,5 j, se situe le pic de production, puis à 13,5 j se terminent les couches superficielles. Cette séquence est à rapprocher de celle que l'on observe dans les parties anciennes du complexe amygdalien (l'aire antérieure et, dans l'ensemble, toutes les fractions antérieures du complexe). Très antérieurement, le claustrum montre une nature fort différente. Cette même séquence est toujours présente, mais il s'y ajoute des neurones plus récents, beaucoup s'observant à 14,5 et même 15,5 j.

En résumé, il y a deux divisions claustrales : un niveau antérieur qui montre un enrobage de cellules relativement récentes autour d'un noyau ancien ; un niveau moyen-postérieur, où n'existe que ce noyau, caractérisé par un léger gradient profondeur-surface et un gradient encore plus discret, dans le sens ventro-dorsal.

4 / Complexe septal

Située ventralement par rapport à la moitié antérieure du corps calleux, se trouve l'aire septale qui comprend le septum proprement dit auquel le noyau accumbens septi est souvent rattaché. Ontogénétiquement, la partie ventrale du septum se différencierait à partir de la pars nuclearis du semi-cortex

du corps paraterminal, tandis que la partie dorsale dériverait, d'après MACCHI (1951) de l'aire hippocampique, en s'isolant par le développement du corps calleux.

Antérieurement, on peut constater qu'il existe un gradient centrifuge très marqué entre les parties centrales (noyau médian) et les parties externes (noyau latéral). Au centre, on trouve des neurones marqués vers 13,5 j. Progressivement, les neurones de 14,5 et 15,5 j se rangent vers la périphérie. On observe quelques neurones marqués à 16,5 j au voisinage de la partie antérieure de l'hippocampe.

Postérieurement, on distingue des neurones de plus en plus anciens dans les parties centrales (noyau médian et noyau du tractus diagonal). Rostralement, le taux de mélange est très élevé entre les différentes générations. Postérieurement, une séparation plus nette s'installe. Le bloc ancien (11,5 j, 12,5 et 13,5 j) interférera peu avec une "écorce" plus récente (qui coïncide à peu près avec le noyau latéral) à l'intérieur de laquelle on observe une séquence toujours centrifuge mais avec une stratification relativement nette (de 14,5 à 16,5 j pour les neurones les plus récents et les plus superficiels). On remarque cependant, en position paracentrale, des ilots très discordants, approvisionnés en neurones extrêmement récents (de 18 à 20,5 j). Ils correspondent aux grands ilots de CALLEJA et devraient plutôt être rattachés, avec tous les ilots, au tubercule olfactif. Encore plus postérieurement, la tendance au renforcement du gradient centrifuge s'accroît. Centralement, le bloc ancien (11,5 à 12,5 j) concerne le noyau triangulaire et le noyau septal de la fimbria. Vers l'extérieur, le noyau latéral présente les mêmes caractéristiques qu'au niveau moyen.

En résumé, dans le septum proprement dit, il existe une partie centrale archaïque, comprenant les noyaux médian, triangulaire du tractus diagonal,

et une partie du noyau de la fimbria. Extérieurement, une "écorce" plus récente (de 13,5 à 16,5 j) correspond au noyau latéral et au reste du noyau de la fimbria.

Quant au noyau accumbens septi, il se différencie entre 14,5 et 16,5 j sans stratification marquée. Ces deux caractéristiques l'apparentent beaucoup au complexe putamino-caudé auquel on le rattache souvent. Dans sa partie la plus antérieure, près du ventricule, on trouve quelques neurones récents (17,5 et 18,5 j) qui coïncident par leur position avec la zone sub-épendymaire (en voie de disparition chez l'adulte).

B - Diencéphale

Le diencéphale des Mammifères est divisé classiquement sur la base de critères embryologiques. En observant le diencéphale embryonnaire, on constate que le mur du 3^e ventricule est renflé par une masse qui deviendra le thalamus proprement dit. Au-dessous, un sillon s'étend de la région de l'aqueduc de Sylvius vers le récessus optique. Ce sillon serait le prolongement du sulcus limitans qui, dans le tube nerveux, constitue la limite entre la lame basale motrice et la lame alaire sensitive. Plusieurs auteurs considèrent que cette distinction fondamentale perd toute validité à partir du mésencéphale (LE GROS CLARK, 1932, etc...). Cependant, ce sillon servira de séparation entre le diencéphale dorsal et le diencéphale ventral (LE GROS CLARK, 1932). Ces deux grandes parties correspondent à 4 subdivisions classiques : le diencéphale dorsal comprend l'épithalamus et le thalamus dorsal, tandis que le diencéphale ventral est composé de l'hypothalamus et du subthalamus (HERRICK, 1910 ; J. ROSL, 1942).

1/ Hypothalamus

Les limites de l'hypothalamus sont encore controversées. KUHLENBECK (1954 a et b) y rattache le subthalamus et le globus pallidus en tant que dérivés de la zone hypothalamique primitive. Ce même auteur divise l'aire préoptique en deux : une zone télencéphalique et une zone diencéphalique. Nous avons, pour notre part, utilisé les subdivisions classiques (WINKLER et POTTER, 1914 ; GURDJIAN, 1927 ; RIOCH et al., 1940).

Les neurones les plus précoces apparaissent dans la région préoptique après une injection de thymidine pratiquée à 11,5 j. Ils sont localisés préférentiellement dans la partie latérale de l'aire, mais certains d'entre eux s'observent dans la partie médiane. A 12,5 j, on trouve les mêmes caractéristiques dans les plans antérieurs avec une proportion importante de neurones dans la partie magnocellulaire préoptique. C'est également à ce stade qu'apparaissent les premiers neurones marqués dans le plan immédiatement postérieur. Ils s'y localisent surtout à la partie magnocellulaire du noyau paraventriculaire et à la partie latérale du noyau antérieur. A un niveau médian, un marquage léger apparaît dans la partie dorsale du noyau dorso-médian, le noyau latéral et surtout le noyau ventro-médian antérieur. A un niveau plus postérieur, toujours pour le stade 12,5, quelques neurones marqués sont localisés dans le noyau pré-mamillaire ventral (couches externes) et beaucoup plus rarement dans le noyau prémamillaire dorsal. La plus grande partie du noyau mamillaire latéral se forme à ce stade, hormis quelques neurones externes déjà en place (11,5 à 12 j).

A 13,5 j, le marquage est intense dans la partie latérale de l'aire préoptique alors que quelques neurones seulement se trouvent disséminés dans l'aire préoptique centrale, avec cependant un pic de densité dans le noyau supra-chiasmatique. A ce stade, certains noyaux hypothalamiques sont marqués, surtout le noyau paraventriculaire magnocellulaire (déclinant), le noyau paraventricu-

laire parvicellulaire et le noyau antérieur (débutant). Plus postérieurement, le marquage se renforce dans la partie dorsale du noyau dorso-médian, le groupe ventro-médian et le noyau postérieur (à son apogée). Dans le complexe mamillaire, les neurones appartenant à ce stade se trouvent dans la partie médiane dorsale du noyau mamillaire et du noyau supramamillaire, tandis que la partie latérale du noyau mamillaire s'achève lentement tout comme le noyau prémamillaire ventral.

A 14,5 j près de la commissure antérieure, les parties médianes de l'aire préoptique sont marquées, zone périventriculaire, suprachiasmatique et médiane du noyau préoptique médian. Plus caudalement, le marquage est maximum dans le noyau antérieur, tandis que le noyau latéral s'achève. Les neurones marqués sont en grand nombre dans les noyaux paraventriculaire parvicellulaire et dorsomédian ventral, et en augmentation dans le groupe ventro-médian, sauf pour la partie antérieure qui est en voie d'achèvement. Dans le complexe mamillaire, les noyaux prémamillaires montrent un maximum de densité dans la partie dorsale, tandis que la partie ventrale est finissante comme le noyau postérieur. Le noyau supramamillaire est bien marqué mais décroissant, tandis que la pars medialis du noyau mamillaire médian est à son apogée.

A 15,5 j, rostralement, on ne trouve de neurones marqués que dans le noyau périventriculaire et les parties centrales des noyaux préoptiques médian, suprachiasmatique et antérieur. A un niveau plus caudal, le marquage est encore intense dans le noyau antérieur, la partie stellato cellulaire du noyau périventriculaire et le noyau paraventriculaire parvicellulaire. Postérieurement, le maximum est atteint dans le noyau ventromédian (sauf la partie antérieure, qui est terminée), tandis que le noyau dorsomédian est en fin d'activité (surtout dans sa partie dorsale). Plus caudalement, le noyau mamillaire médian est en voie d'achèvement tandis que des neurones marqués apparaissent maintenant dans le noyau mamillaire prélatéral et le noyau arqué.

A 16,5 j, antérieurement le marquage ne concerne que le noyau supra-chiasmatique, plus légèrement le périventriculaire préoptique et quelques neurones du noyau antérieur. Au niveau moyen, le périventriculaire est en pleine activité tandis que, caudalement, le noyau arqué continuera à être marqué tardivement (17,5 j).

Le seul gradient net dans l'hypothalamus est latéral-central ; il se maintient à tous les niveaux, ce qui n'est pas le cas des autres gradients hypothalamiques (dorsal-ventral en particulier).

2/ Epithalamus, subthalamus et thalamus

L'épithalamus constitue un renflement allongé, qui s'étend en arrière de la région du foramen interventriculaire jusqu'à la base du diverticule pinéal. Il est essentiellement composé des noyaux habénulaires, mais J. ROSE (1942) y intègre le noyau paraventriculaire et les noyaux prétéctaux. Le subthalamus est composé de faisceaux et de masses nucléaires (cellules de la zone incerta, noyau subthalamique de LUYSS, noyau entopédonculaire) qui, comme le remarque LE GROS CLARK (1932), forment une chaîne discontinue entre les noyaux de la région tegmentale (noyau rouge, substance noire, noyaux réticulaires) et le striatum, pour participer à la contribution de la voie motrice extra-pyramidale. Le thalamus forme la majeure partie du diencéphale dorsal et représente un maillon essentiel entre le néopallium et les niveaux inférieurs du SNC. Certains auteurs individualisent les corps genouillés du thalamus en un métathalamus (HERRICK, 1910 ; WALKER, 1938, 1966). Le thalamus est divisé en deux groupes (LE GROS CLARK, 1932) : les noyaux principaux, qui sont bien circonscrits par la lame médullaire et comprennent différents groupes (antérieurs, médians, latéraux, WALKER, 1938) et les noyaux intralaminaires, que l'on trouve dans la lame médullaire interne (paracentralis, centralis latéralis, parafascicularis). Cette nomenclature se retrouve en partie dans la classification de ROSE et

WOOLSEY (1949), qui proposent une séparation en noyaux extrinsèques (phylogénétiquement stables ou peu variables) et noyaux intrinsèques, au comportement inverse (en particulier, les noyaux de la ligne médiane et intralaminaires). Comme les résultats chronoarchitectoniques ne correspondent étroitement à aucune de ces classifications, nous avons choisi de décrire ces noyaux suivant une hiérarchisation chronologique et en les groupant lorsque les ressemblances entre leurs lois d'équipement permettaient de le faire.

. Noyaux réticulaires et zona incerta

Ils constituent une lame ancienne dont les premiers neurones se différencient vers 11,5 j, surtout dans la zona incerta médiane. Vers 12,5 j, le marquage se propage latéralement et intéresse la quasi-totalité de cet ensemble. L'achèvement s'observe à 13,5 j pour les parties postérieures et 14,5 j pour celles situées antérieurement. La zona incerta est plus homogène que les noyaux réticulaires et un faible mélange n'y apparaît que dans les régions médianes, au voisinage de noyaux plus récents.

. Corps genouillés

La première région à être marquée est la partie ventrale du corps genouillé latéral, où on trouve des neurones du stade 11,5 dans les couches latérales. Dans ce même noyau, la pars dorsalis montre de nombreux neurones marqués un jour après (12,5 j). A ce moment, la partie ventrale présente son maximum de densité. A 13,5 j, le corps genouillé latéral s'achève par les couches médio-dorsales. En résumé, on observe deux légers gradients dans ce noyau : ventral-dorsal et latéral-médian.

Pour le corps genouillé médian, la séquence est identique (début à 11,5 j, avec maximum vers 12,5 j et fin à 13,5 j), mais le léger gradient observé est inverse au précédent (couches latérales plus récentes).

. Noyaux latéral postérieur, supragéniculé et prétectaux

Tous ces noyaux présentent de nombreux neurones anciens (11,5 j) et ont leur maximum de densité vers 12,5 j. Leur achèvement coïncide avec le stade 13,5 j pour le latéral postérieur et plus tardivement pour les portions caudales des autres (14,5 j dans l'ensemble).

. Noyau latéral

Ce noyau est très large au niveau diencéphalique moyen. En raison du gradient latéro-médian très prononcé dans le thalamus, on y trouvera une succession marquée d'isochrones. Latéralement, la séquence débute par quelques neurones à 12,5 j ; la partie médiane du noyau est surtout composée de neurones du stade 13,5 j, alors que la partie interne montre de nombreux neurones à 14,5 j et peu au-delà. On trouve un léger gradient caudo-rostral lié à la présence de quelques cellules anciennes (12,5 j) dans l'extrémité caudale.

. Noyau ventral

Dans sa partie antérieure, ce noyau débute par quelques cellules à 12,5 et 13,5 j en position latérale ; son maximum coïncide avec le stade 14,5 qui concernera surtout les régions les plus internes. Au niveau moyen, des caractéristiques identiques (séquence et gradient) s'observent globalement. Cependant, les divisions ventrale et dorsomédiane sont surtout composées de neurones du stade 13,5 sauf pour leur zone extérieure qui montre une majorité de neurones plus anciens (12,5 j surtout), tandis que la partie médiane du noyau est essentiellement formée de neurones du stade 14,5. Au niveau postérieur, les parties ventrale et dorsomédiane présentent des caractéristiques inchangées (maximum vers 13,5 j) sauf pour les couches superficielles de la division dorsale qui présentent maintenant des neurones plus récents (14,5 j). Latéralement le noyau ventral possède de nombreux neurones anciens (12,5 j) mais, fait nouveau et contraire au gradient latéro-médian qui se dégage des observations

précédentes, la partie médiane de ce noyau en recèle également. Il est probable que le voisinage de la zona incerta riche en neurones anciens, peut expliquer ce fait.

. Noyau medialis

Sa différenciation correspond au maximum de production des zones ventriculaires. On y observe très nettement l'effet du gradient. Les neurones du stade 13,5 se localisent surtout à la pars lateralis, suivis des neurones du stade 14,5 qui se placent dans la pars medialis. Dans cette dernière, on trouve quelques neurones plus récents (15,5 j) dans sa partie la plus antérieure.

. Noyaux parafasciculaire et suprafasciculaire

A leur niveau antérieur, on ne trouve que des neurones d'âge intermédiaire (13,5 et 14,5 j), les parties centrales étant un peu plus récentes que les latérales (gradient latéro-médian). Signalons que la partie externe correspond au centre médian ; ce dernier serait donc un peu plus ancien que le noyau parafasciculaire. Conséquence d'un gradient caudo-rostral, on constate postérieurement un décalage de la séquence avec l'apparition en position latérale de neurones plus anciens (12,5 et 13,5 j).

. Noyaux antérieurs

Les trois divisions du groupe antérieur (dorsale, médiane et ventrale) présentent la même séquence globale, mais l'effet du gradient latéro-médian change les proportions relatives des différentes générations qui la composent. La séquence débute avec des neurones assez anciens (12,5 j) localisés surtout latéralement (noyaux antérieur ventral et antérieur dorsal). La grande majorité des neurones sont produits vers 13,5 j tandis que les neurones plus récents (14,5 j) s'observent dans les parties médianes en général et dans le noyau anterior medialis en particulier.

. Noyaux parataenialis, periventriculaire, reuniens et rhomboïde

Tous ces noyaux ont en commun une position centrale qui, en raison des

caractéristiques du gradient latéro-médian, leur vaut de ne recevoir que des neurones d'âge intermédiaire ou récent. Le début de séquence met cependant en jeu des neurones plus anciens (13,5 j) surtout dans le noyau parataenialis. Les maximums s'observent à 14,5 ou 15,5 j en fonction de la position plus ou moins latérale du noyau. De la même façon, l'achèvement varie de 16,5 pour le noyau parataenialis à 17,5 j pour le noyau periventriculaire (pars stellato-cellularis).

Les noyaux rhomboïdes et reuniens ont des caractéristiques voisines de celles du noyau parataenialis, mais l'achèvement en est plus précoce .

. Noyaux habénulaires

Le noyau habénulaire latéral débute vers 12,5 j dans ses parties latérales et s'achève à 14,5 j dans ses parties centrales. Le noyau médian commence vers 14,5 j dans la partie qui jouxte le noyau habénulaire latéral, s'épanouit vers 15,5 j et, en direction du centre, présente ensuite des couches de plus en plus récentes de neurones, de 16,5 à 18 j.

En résumé, il apparaît très nettement que le diencephale dorsal s'organise principalement suivant un gradient fondamental latéro-médian, auquel se superposent 2 gradients moins stricts (caudo-rostral et ventro-dorsal).

C/ Mésencéphale et rhombencéphale

1/ Tectum

Les cellules les plus anciennes se situent dans le stratum griseum mediale (11,5 j). A 12,5 j, on en trouve dans le stratum griseum profundum mediale et superficiale. Vers 13,5 j, on trouve de nombreux neurones marqués dans les stratum griseum profundum mediale et superficiale. A 14,5 ils sont peu nombreux dans le stratum griseum profundum, en proportion moyenne dans le stratum griseum mediale et très nombreux dans le stratum griseum super-

ficiale. Au stade 15,5 ils sont peu dans le stratum superficiale, sauf dans sa partie la plus postérieure où on en trouve même à 16,5 j. On constate donc un gradient ventro-dorsal net, mais avec taux de mélange très élevé, et un très léger gradient rostro-caudal, au moins pour la couche la plus superficielle du stratum superficiale (stratum zonale de CAJAL). Ce dernier gradient s'explique par le voisinage du colliculus inférieur qui, contrairement à tout ce que l'on pouvait prévoir présente dans l'ensemble des neurones plus récents que ceux du colliculus supérieur. On distinguera un peu arbitrairement deux divisions dans le colliculus inférieur : une "racine" d'âge intermédiaire, qui correspond sensiblement au noyau du tubercule postérieur (CAJAL, 1911) recouverte par une écorce plus récente ou région capsulaire. Les parties les plus ventrales et antérieures du noyau débutent nettement vers 13,5 j ; par la suite, les neurones marqués envahissent la totalité du noyau (14,5 j). Vers 15,5 j ce sont essentiellement les parties dorsales et centrales du noyau et de l'écorce dans leur fraction antérieure qui sont marquées. Ce seront ensuite et très progressivement les régions de l'écorce situées les plus dorsalement et les plus caudalement qui seront atteintes. Vers 18 j, l'équipement de la partie la plus superficielle et postérieure du tectum sera terminé.

2 / Substance grise centrale

Affectée par un gradient ventro-dorsal prononcé, les parties les plus anciennes de la substance grise centrale sont donc ventrales. A leur niveau, les premiers neurones correspondent aux stades 11,5 et 12,5. Dans l'ensemble, la substance grise reçoit des neurones dont la majorité se différencie vers 13,5 j ; cependant, les parties latérales et surtout dorsales en recevront aux stades 14,5 et 15,5 respectivement.

3/ Noyaux de la calotte et du plancher

Nous venons de voir que le tectum était caractérisé par un gradient ventro-dorsal très net, qui se manifestait à partir du stratum griseum profundum en direction du stratum griseum superficiale. On constate que ce gradient s'inverse ensuite à partir de la substance grise centrale et en direction de la base. Ainsi, pour l'ensemble du mésencéphale, le gradient global peut être qualifié de centrifuge. La conséquence en est que la calotte est plus archaïque que la région du plancher. Sur le plan chronoarchitectonique, si l'on distingue assez nettement deux subdivisions, on peut cependant remarquer qu'elles ne coïncident pas exactement avec les deux régions sus-nommées. Nous distinguerons une zone centrale, ancienne, et une zone basale, plus récente.

a/ Zone centrale

Elle s'étend en direction latérale et ventrale autour de l'aqueduc de Sylvius et comprend essentiellement la formation réticulée, le noyau rouge et les noyaux médians. Dans ces derniers, on trouve le noyau interstitiel de CAJAL, le noyau linéaire, les noyaux médian et dorsal du raphé, les noyaux tegmentaux ventral et dorsal, les noyaux ventraux du lemniscus latéral et les noyaux des III^e, IV^e et V^e paires de nerfs crâniens (ce dernier en position plutôt latérale). Les neurones de cette région sont archaïques et contemporains, pour la plupart, du stade 11,5. On en trouve d'encore plus anciens (10,5 - 11 j) dans le noyau rouge, le noyau interstitiel, le noyau de Darkschewitsch et les noyaux ventraux du lemniscus latéral. Cependant, dans tous les cas, on observe encore quelques neurones du stade 12,5 en nombre variable suivant la structure. Caudalement, les noyaux du raphé en comprennent une majorité. Pour la totalité de cette zone centrale, les neurones plus tardifs sont rares.

b/ Zone basale

Cette zone, qui groupe la substance noire, l'aire tegmentale

ventrale et le noyau interpédonculaire, débute de façon significative un peu plus tardivement que la précédente. Les neurones les plus anciens, que l'on y trouve en nombre appréciable, sont du stade 11,5. Mais la différence fondamentale réside dans la durée plus longue de la séquence, qui s'étend de 11,5 à 14,5 j. Les maximums d'approvisionnement coïncident à peu près avec le stade 12,5.

4/ Noyaux du pont, noyaux de la calotte pontique, noyaux du corps trapézoïde et du lemniscus latéral

Les premiers neurones marqués apparaissent au stade 11,5 dans le noyau tegmenti pontis dans sa partie la plus dorsale ; les neurones du stade 12,5 gagnent ventralement ce noyau et apparaissent en masse, postérieurement, dans le noyau du corps trapézoïde.

A 13,5 j, seule la partie médiane des noyaux pontiques est bien marquée ; à ce stade le noyau tegmenti pontis est encore très actif et il s'achève par l'apport d'un dernier contingent de neurones du stade 14,5. C'est à ce moment que les noyaux pontiques atteignent leur maximum. A 15,5 j, le pont est en phase d'équipement neuronique décroissant, sauf pour les parties les plus latérales et superficielles de son segment postérieur. C'est à ce stade que sont produits la plupart des neurones du noyau ventral caudal du lemniscus latéral. Au stade 16,5, quelques rares neurones parviennent encore à ces dernières régions. On distingue donc plusieurs gradients : le premier est dirigé dorso-ventralement, ce qui explique la relative précocité du noyau tegmenti pontis par rapport aux noyaux du pont ; le second est medio-latéral dans les noyaux pontiques ; enfin il en existe un troisième, moins défini, de type rostro-caudal.

5/ Noyaux bulbaires et cérébelleux

Les caractéristiques observées à ces niveaux sont voisines de

celles définies précédemment.

On y retrouve un axe ancien (10,5 j), situé péricentralement ; il correspond aux neurones de la formation réticulée. Au stade 11,5, les neurones atteignent l'ensemble du bulbe et forment une auréole autour des précédents. Les neurones du jour suivant se groupent encore un peu plus près de la surface bulbaire et envahissent les noyaux cérébelleux. Au stade 13,5, les neurones bulbaires se localisent plutôt en position périphérique dorsale ou ventrale et se raréfient fortement dès 14,5 j, ce qui correspond pratiquement à l'achèvement de tous les noyaux. A partir de 15,5 j apparaît un phénomène qui intéresse tout d'abord le bulbe. On observe à ce stade l'apparition de petites cellules disséminées, sans gradient sauf dans les noyaux cochléaires où une concentration très importante s'observe. Ce phénomène continuera à bas bruit dans ces zones vers 16,5 j et ensuite se déplacera en direction du cortex cérébelleux, où la production ira en s'accélégrant jusqu'à la naissance et au-delà, comme certains auteurs l'ont montré. En ce qui concerne les cellules de PURKYNĚ, elles sont produites comme la plupart des neurones de ce niveau, c'est-à-dire entre 11,5 et 14,5 J.

DISCUSSION

A - Télencéphale

1/ Isocortex

a/ Sens du gradient chronologique

Contrairement à la conception de TILNEY (1933), les travaux récents entrepris chez le Rat (HICKS et D'AMATO, 1959, 1961, 1968 ; BERRY et al., 1964), la Souris (ANGEVINE et SIDMAN, 1961, 1962 ; LANGMAN et WELCH, 1967) ou le Hamster (SHIMADA et LANGMAN, 1970) ont démontré que les neuroblastes se disposent dans l'isocortex selon un gradient centrifuge. Nos résultats sont totalement concordants avec les travaux précités quant au sens de ce gradient, mais l'existence d'un chevauchement important des différentes générations cellulaires nous oblige à le considérer comme une notion relative.

b/ Séquence isocorticale

TILNEY (1933) distinguait trois vagues successives dans la séquence corticale, la première intervenant entre 16 et 17 jours, la seconde du 18^e au 19^e jour et enfin la dernière du 20^e au 21^e jour. BERRY et al. conclurent à la même séquence. Nos résultats diffèrent profondément. En effet, dans la plupart des zones isocorticales, les neurones les plus anciens sont émis bien avant le 16^e jour (13,5). Une première explication peut en être trouvée dans la méthode de datation qui est différente. Le jour qui suit la copulation est considérée comme le jour 1 pour BERRY et al., et jour zéro pour nous. Il reste néanmoins une différence sensible, qui ne peut s'expliquer que par le choix *a priori* du 16^e jour comme premier jour d'expérimentation par ces auteurs. Or, dans une étude destinée à mesurer les vitesses de migration des neuroblastes corticaux, HICKS et D'AMATO (1968) ont noté que les premiers d'entre eux se

différenciaient chez le Rat vers le 14^e jour, date voisine de la nôtre.

Quant à la fin de la séquence corticale, l'accord est général pour penser qu'elle se termine dans l'ensemble vers la naissance. Toutefois, une faible proportion des neurones les plus superficiels pourrait être différenciée après la naissance, comme l'ont signalé SHIMADA et LANGMAN (1970) chez le Hamster. Chez le Rat, ALTMAN et DAS (1966) ont émis l'hypothèse qu'un certain nombre de neurones corticaux de type étoilé pourraient avoir une origine post-natale. Mais, alors que la réalité d'une telle microgenèse postnatale n'est absolument pas mise en doute pour d'autres structures, aucune confirmation de cette hypothèse n'a été apportée depuis. Il est donc vraisemblable que la quasi totalité des neurones corticaux sont d'origine prénatale et que l'apport post-natal en microneurones est un phénomène qui n'intéresse pas l'isocortex ou alors très peu et, en proportion sans commune mesure avec celle que l'on observera dans le cortex cérébelleux, le bulbe olfactif ou la corne d'Ammon.

c/ Continuité temporelle et spatiale de la séquence

Depuis TILNEY (1933), de nombreux travaux, même récents, décrivent l'apparition des neurones corticaux comme organisée en une succession de vagues cellulaires. En fait, TILNEY, distinguait 3 vagues fondamentales, alors que les auteurs contemporains décrivent autant de vagues que de jours d'injection distincts. Ainsi, il y aurait la vague de 15 jours précédant celle de 16 jours et ainsi de suite. Effectivement, l'injection flash conduit au marquage d'un ensemble cellulaire qui paraît homogène, car le résultat radioautographique observé se présente bien sous la forme d'une bande de cellules marquées. En réalité, dans l'ensemble de la zone ventriculaire (cf. chapitre II), il n'existe pas deux cellules qui soient très exactement au même stade ; cependant, comme la phase de synthèse de l'ADN est longue (6 h) le nombre de cellules tou-

chées par le marquage sera élevé. Le phénomène de base étant de type continu (population en division asynchrone), l'image de vagues cellulaires ne repose donc sur aucune réalité fondamentale, mais en raison des caractéristiques méthodologiques ("pulse labelling") il est compréhensible qu'elle puisse s'imposer à l'observateur. Il n'en va pas de même quant à la représentation topographique des ensembles cellulaires marqués et leur schématisation sous la forme d'une succession de bandes sans chevauchement est absolument erronée. Nos observations démontrent au contraire l'importance du mélange des différentes générations. Au niveau du cortex profond, on trouve ainsi jusqu'à 35 % de cellules plus récentes, dont certaines très récentes (stade 17,5 et au-delà). Ce phénomène conduit à un véritable "rajeunissement" des couches les plus anciennes par l'apport de contingents cellulaires plus récents. Il n'a cependant pas été possible d'affecter à ces contingents des caractéristiques cytologiques propres. Nous n'avons pu en particulier vérifier jusqu'à présent l'hypothèse d'un diamètre réduit pour de telles cellules ; un travail statistique plus poussé en la matière est en cours. Pour les couches corticales plus superficielles (IV, III, II), les proportions de mélange observées précédemment sont inchangées, tandis que l'étendue du phénomène diminue au fur et à mesure que le débit neuroblastique régresse.

d/ Isochrones corticaux

Nous venons de voir que l'interpénétration des différentes générations cellulaires ne permet pas de considérer les cellules marquées à une date déterminée comme formant un ensemble spatialement bien délimité. Cependant, l'étude des variations transcorticales du P% montre que cet ensemble est toujours caractérisé par un maximum de densité. Ce maximum est bien confirmé par les couches photométriques sur radioautogrammes ^{14}C et, par définition, la projection de ce maximum sur le plan de coupe sera appelée isochrone. En réali-

té, les courbes photométriques transcorticales ne montrent pas seulement un maximum et on y distingue souvent plusieurs pics (Pl. IV D, stade 15,5).

Pour interpréter ce phénomène, on pense immédiatement aux particularités du marquage des zones ventriculaires, qui impliquent que la production des neuroblastes marqués est alternative alors qu'à la base le phénomène reste de type continu. Cette alternance entre les cellules marquées et non marquées est d'ailleurs à la base de la méthode de détermination du cycle génératif par la méthode des mitoses marquées (QUASTLER et SHERMAN, 1959). Il semblerait que l'on puisse expliquer de la même manière les sommets successifs et décroissants (par dilution du marquage) des courbes photométriques transcorticales ; les creux séparant les sommets correspondraient alors à des zones de minimum de densité de cellules marquées. Or, dans les courbes de P % ou de MG (Pl. IV C), on ne retrouve jamais de telles variations. Il faut donc chercher une autre explication au phénomène. La photométrie des radioautogrammes au ^{14}C met essentiellement en évidence des différences globales de densité des grains d'argent, paramètre qui, s'il dépend de la MG et du P%, est également tributaire de la densité neuronique générale. En l'absence d'oscillations des paramètres P% et MG (Pl. IV C), il est donc probable que les pics secondaires des courbes ^{14}C révèlent les maximums de densité neuronique (lamination). Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par l'alignement de ces pics (Pl. IV D ; stades 14,5 - 15,5 et 16,5) sur la couche IV, qui est effectivement une zone de haute densité neuronique puisqu'elle recèle environ 25 % des neurones de l'isocortex (Pl. IV E, fig. 2). Notons que cette valeur a été obtenue sans tenir compte de la correction d'ABERCROMBIE (1946) mais recoupe néanmoins les résultats de BRIZZEE et al. (1968), qui obtiennent chez le Rat une courbe de densité neuronique proche. En résumé, les isochrones obtenus par photométrie des radioautogrammes ^{14}C coïncident bien avec ceux définis par l'étude de la MG et du P%, à

la condition d'éliminer l'influence des variations de densité cellulaire. Celles-ci en effet peuvent faire apparaître des pics le plus souvent secondaires, mais parfois plus importants que ceux qui correspondent à l'isochrone.

e/ Datation stratigraphique corticale

Il n'est pas possible d'affecter une date, même moyenne, aux couches isocorticales. Le pattern en varie considérablement selon les régions et une couche corticale déterminée sera composée de neurones d'âges différents suivant que l'on s'adresse au cortex latéral ou au cortex dorsal. En exprimant ce résultat différemment, on peut dire que les "laminations" corticales et les isochrones ne sont pas concentriques. Ceci démontre clairement qu'il n'y a pas d'analogie entre les générations neuroblastiques et les "laminations". Nous verrons plus loin qu'il faut peut-être faire la différence entre la chronologie absolue des neurones (neurones de tel jour) et leur chronologie relative. Cette dernière notion pourrait exprimer le nombre de divisions au terme desquelles a lieu la différenciation du neuroblaste par rapport à une étape précise du cycle évolutif des zones ventriculaires. Nous avons vu que ces zones ventriculaires n'évoluent pas synchroniquement et qu'il existe un gradient schématiquement caudo-rostral (loi d'hétérochronie). Dans ce cas, on peut admettre que, si des neuroblastes produits simultanément aux niveaux caudal et rostral sont analogues sur le plan de la chronologie absolue, ils ne le sont pas quant à la chronologie relative. Inversement, il n'est pas impossible que des cellules d'âge absolu différent soient analogues quant au nombre de divisions qui précèdent leur différenciation. L'existence d'une chronologie absolue et d'une chronologie relative n'a jamais été envisagée à notre connaissance et il est probable que les rapports qui existent entre l'âge de différenciation des cellules et, par exemple, leur taille tiennent beaucoup à leur chronologie relative. Des rapports comparables sont prévisibles d'un point de vue

physiologique. Nous ne discuterons pas dans le détail les résultats obtenus à tous les niveaux de l'isocortex et résumés sur les cartes de synthèse (Pl. 88 à 97), faute d'étude comparable chez le Rat ou tout autre animal. HICKS et D'AMATO (1968) ont cependant observé chez le Rat une séquence analogue à celle que nous décrivons et ont également noté sans les détailler des variations du pattern entre les secteurs latéraux et dorsaux du cortex cérébral.

f/ Evaluations quantitatives de la séquence corticale

En plaçant en correspondance les isochrones et la courbe de densité cumulée des neurones (Pl. IV E, fig. 3 et 4), on peut remarquer que la majorité d'entre eux sont produits très tôt (entre 13,5 et 15,5 j) ; ensuite, la décroissance est très rapide et les neurones récents (au-delà de 17,5 j) ne représentent que 16 % de l'ensemble.

Ces résultats supposent quelques hypothèses qu'il nous faut discuter brièvement. La première est que tous les neurones ou presque (100 % - X de la fig. 3, Pl. IV E) sont d'origine prénatale, malgré le doute qui subsiste encore actuellement à ce sujet. La seconde hypothèse est que les caractéristiques de chevauchement des différentes générations sont identiques. Ceci est probablement vrai en ce qui concerne la forme des "vagues", mais ne l'est plus quant à l'étendue du chevauchement, en raison des variations du débit neuroblastique. Ces résultats quantitatifs sont donc des valeurs approchées.

2/ Allocortex

a/ Paléocortex

* Pédoncule et tubercule olfactifs

Les premières cellules paléocorticales à se différencier sont celles du bulbe accessoire ; peu après la naissance, elles sont déjà groupées,

ce qui n'est pas le cas des cellules initiales du bulbe principal qui, pourtant, se différencient peu après (respectivement 11,5 et 12,5 j). Ce fait confirme que le bulbe accessoire est une zone très primitive et la rapidité exceptionnelle du groupement des cellules qui la constituent permet de formuler l'hypothèse selon laquelle son entrée en fonction est très précoce. Quant au noyau olfactif proprement dit, la production de ses neurones est comprise entre 13,5 et 17,5 j ; un léger gradient centrifuge semble exister entre les couches les plus internes et les plus externes. Dans l'ensemble, nous retrouvons là les résultats de HINDS chez la Souris (1968). Celui-ci a démontré que les cellules les plus grosses (mitrales) se différencient les premières. S'il est exact que les cellules mitrales et les cellules triangulaires de CAJAL précèdent les grains internes ou externes, il n'en est pas tout à fait de même pour les cellules moyennes (cellules à panache), qui sont produites au départ en même temps que les cellules mitrales bien que leur différenciation persiste plus longtemps. Comme dans beaucoup d'autres cas, il est ici certain que les microneurones sont les éléments cellulaires produits les derniers, mais une relation directe entre le diamètre et l'âge ne semble pas toujours vérifiable pour tous les neurones. Une différence sensible existe également entre les grains du bulbe accessoire et ceux du bulbe proprement dit. Les premiers sont produits très peu de temps après les neurones moyens et leur production semble stoppée à 17 jours. Or, c'est précisément à cette date que les grains du bulbe principal sont produits en masse. Ce processus se poursuit bien après la naissance, essentiellement à partir de la zone sub-épendymaire (MESSIER et al., 1958 ; SMART, 1961 ; ALTMAN , 1969 ; HINDS, 1968).

Dans le tubercule olfactif, un phénomène très comparable intervient dans les ilots de CALLEJA, ce qui n'avait jamais été signalé auparavant. Les microneurones qui constituent ces formations y sont également produits d'une façon chronologiquement discordante et leur séquence rappelle beaucoup celle que

l'on trouve dans le bulbe accessoire et la massa intercalata (archistriatum).

* Autres zones paléocorticales

Elles sont caractérisées par un gradient centrifuge net, qui avait déjà été observé chez la Souris (HINDS et ANGEVINE, 1965). La séquence chronologique (12,5 - 16,5 j) est homogène, tandis qu'un léger gradient rostro-caudal se manifeste par une diminution de l'importance relative des couches les plus anciennes. A ce point de vue, ces régions sont donc très proches des précédentes (pédoncule et tubercule), mais la différence essentielle réside dans l'absence d'apport en microneurones récents (îlots de CALLEJA).

b/ Archicortex

Nos résultats peuvent être comparés à ceux d'ANGEVINE (1965) chez la Souris, tout au moins en ce qui concerne les lois générales de la neuro-genèse, car les différences entre les espèces animales rendent difficile toute comparaison dans le détail. ANGEVINE (1965) a constaté deux gradients différents. Le premier, centrifuge, intéresse les neurones de taille moyenne ou élevée (pyramides), tandis que le second, inversé, est créé par les microneurones du stratum granulosum. Pour notre part, si nous avons bien noté le premier, nous avons manqué d'élément pour définir le second. En effet, ces microneurones se différencient pour la plupart postnatalement et jusqu'à l'âge adulte (ALTMAN, 1963, 1966 ; ANGEVINE, 1965). ANGEVINE (1965) remarque également des variations du pattern le long de l'hippocampe : de la région subiculaire jusqu'à l'extrémité du gyrus dentatus, on trouve progressivement moins de neurones anciens et davantage de neurones récents. L'auteur voit là un argument en faveur de la conception du morcellement du cortex cérébral (ANGEVINE, 1965 p. 31) mais pour notre part, nous ne pensons pas que l'on puisse interpréter ainsi ce fait.

Le concept du morcellement cérébral repose sur l'hypothèse que chaque aire corticale définie à partir de critères architectoniques serait le siège d'activités électriques spécifiques ayant une correspondance fonctionnelle (BROCA, 1865 ; BRODMANN, 1909). Le cortex a ainsi été divisé en aires plus ou moins nombreuses (CAMPBELL, 1905 ; O et C VOGT, 1919 ; M. ROSE, 1929). KUHLENBECK (1929) en défendant le concept d'un cortex non morcelé ne conteste pas l'existence de variations "horizontales" des patterns corticaux, mais il fait observer que ces variations s'opèrent selon des gradients ; il souligne en particulier l'existence d'un tel gradient entre les grandes pyramides de la corne d'Ammon et les petits neurones de la fascia dentata (KUHLENBECK et al., 1960). Cette conception est partagée par FILIMONOFF (1947) et BAILEY et BONIN (1947).

Nos résultats dans l'isocortex ont démontré que les isochrones et les strates histologiques ne sont pas concentriques ce qui signifie qu'il existe une certaine indépendance entre l'âge de production du neurone et son évolution morphologique (et fonctionnelle ?). En conséquence, au sein d'une population cellulaire morphologiquement homogène (comme dans l'hippocampe) les différences d'âge des neurones n'ont pas nécessairement pour corollaire des propriétés fonctionnelles différentes. En conclusion, si les variations des patterns chronoarchitectoniques ne constituent pas à nos yeux une preuve permettant de prendre parti, en revanche, le fait que ces variations soient très progressives viendrait plutôt à l'appui du concept d'un cortex non morcelé.

La mise en parallèle de l'archicortex et du paléocortex permet diverses remarques. Il s'en dégage d'abord quelques ressemblances : présence d'un gradient centrifuge léger ; faible gradient axial et haute interpénétration des couches composées de neurones d'âge moyen ou récent ; apports de microneurones récents. Il existe aussi des différences, mais qui tiennent toutes au "noyau ancien" que l'on trouve seulement à la base du paléocortex. Par sa présence, ce

noyau renforce le gradient centrifuge, fait apparaître un gradient rostro-caudal important et élargit considérablement la séquence. De telles différences montrent bien que le groupement de l'archi- et du paléocortex en un allocortex ne repose que sur le fait qu'ils sont incomplets (cortex incompletus, FILIMONOFF, 1947, ou hétérogénique BRODMANN, 1909) par rapport à l'isocortex (cortex completus ou homogénique). Or, sur le plan chronoarchitectonique, nous voyons autant de raisons de les séparer de l'isocortex que de les grouper, car l'isocortex lui-même n'est vraiment complet que sur une bande très étroite. Celle-ci correspond approximativement au secteur latérodorsal et, encore, les neurones archaïques du claustrum (12,5 j), font-ils défaut à ce niveau. De part et d'autre en direction basale (vers le paléocortex), on assiste à un renforcement de la fraction archaïque et un appauvrissement accentué en neurones récents, tandis qu'en direction dorsale et dorso-médiane (vers l'archicortex), il y aura appauvrissement à la fois en neurones anciens et récents. Classiquement, ces zones intermédiaires ne prennent le nom de cortex transitionnel que près de la scissure rhinale (péri-semi-cortex de FILIMONOFF) ou en position interhémisphérique (périarchicortex de FILIMONOFF, cortex parahippocampique de KUHLENBECK) et on voit combien il est arbitraire d'assigner des limites aussi précises à de telles subdivisions.

3/ Striatum

a/ Archistriatum

L'archistriatum dérive en grande partie de l'éminence ganglionnaire, formation embryonnaire qui donnerait également naissance à l'essentiel du bloc néo-paléo-strié (KALLEN, 1951 ; ESCOLAR, 1958). Le reste de l'archistriatum dériverait de formations allocorticales et diencephaliques. MACCHI (1951) considère que le complexe amygdalien dérive de l'aire périventriculaire ou de

la masse centrale de l'éminence ganglionnaire. Nos résultats confirment la grande hétérogénéité du complexe amygdalien. Comme SIDMAN et ANGEVINE (1962) l'avaient noté chez la Souris et chez le Rat un léger gradient peut être distingué au niveau moyen entre le groupe médio-basal et les parties latérales. Mais la caractéristique essentielle est l'existence d'un très fort gradient rostro-caudal, lié certes à la nature globalement télencéphalique de l'archistriatum, mais surtout à son hétérogénéité. En prenant comme exemple les noyaux corticaux, on note qu'à leur niveau caudal la séquence est de type paléocortical, tandis que leur portion rostrale contient des neurones très archaïques (11,5 j). On peut voir là une confirmation partielle de la conception du rattachement des noyaux corticaux au striatum.

D'un autre côté, nos résultats chronoarchitectoniques (gradient axial) ne coïncident pas avec les subdivisions classiques -organisées davantage dans le plan transversal que dans le plan para-axial- et sont en contradiction avec les conceptions de l'origine unique du complexe amygdalien (PATAY et al., 1956). En revanche, ils rejoignent les conceptions d'ARIËNS-KAPPERS (1920-1921, 1928) et JOHNSTON (1923). Ces auteurs distinguaient une masse principale ancienne (épistriatum d'ARIËNS-KAPPERS), dérivant du striatum primitif et de situation antéromédiane, et une masse moins importante (olfactostriatum) qui proviendrait du paléopallium et serait représentée par les noyaux baso-latéraux.

b/ Néostriatum et paléostriatum

Pour certains auteurs, le paléostriatum serait soit d'origine diencéphalique (STRASSER, 1920 ; SPATZ, 1921, 1924, 1925), soit télencéphalique (KAPPERS, 1923, 1947 ; GRÜNTAL, 1941, 1952). Des travaux récents effectués en histologie classique (KUHLENBECK, 1954 b ; KAHLE, 1958 ; RICHTER, 1965) tendent à confirmer la première opinion, en faisant du pallidum une formation sous-thalamique (KAHLE, 1958). Nos résultats apportent une confirmation chronoarchitec-

tonique à cette théorie. La séquence pallidale diffère en effet profondément de la séquence du néostriatum par le fait que les dates de début et de fin de formation sont fortement décalées l'une par rapport à l'autre. L'absence de gradient net dans le pallidum pourrait également constituer un argument supplémentaire. Plus précisément, nos résultats montrent clairement qu'il existe une continuité chronologique entre le diencephale et le télencéphale, qui se traduit par l'enfoncement d'un axe de neurones anciens (diencephaliques ?) dans la vésicule télencéphalique. Mais si la partie ventro-médiane du pallidum fait probablement partie du diencephale car elle ne montre effectivement aucune différence avec le corps sous-thalamique (diencephalique), il n'en va pas de même des régions pallidales latérales, qui présentent de nombreux neurones d'âge moyen en concordance avec les couches du néostriatum. Comme nous l'avons exposé pour d'autres structures, les résultats chronoarchitectoniques soulignent l'existence générale de gradients et l'impossibilité d'établir des frontières entre des régions phylogénétiquement et ontogénétiquement différentes. Le pallidum est ainsi un exemple de structure de transition diencephalique (pallidum interne), s'épanouissant progressivement par sa racine en frondaisons télencéphaliques (pallidum externe et néostriatum).

Le néostriatum ne montre pas, chez le Rat de séparation entre noyau caudé et putamen. C'est une structure élaborée au terme d'une séquence parmi les plus longues qui soient. On y trouve en effet des neurones anciens (12,5 j) moyens et récents et, sur ces critères, on peut lui associer le noyau accumbens septi. Récemment, DAS et ALTMAN (1970) ont mis en évidence une neurogenèse post-natale dans ce complexe et le noyau accumbens septi. Fait surprenant, cet apport concernerait des cellules de taille moyenne et non pas des microneurones.

c / Claustrum

L'appartenance anatomique de cette formation est très discutée. KUHLENBECK (1924) puis MACCHI (1951) notèrent ses relations avec la fonction olfactive, ce qui, pour ce dernier auteur, la rattachait indiscutablement au rhinencéphale. Cependant, le claustrum est également en relation avec les structures régissant les mécanismes de la parole (LANDAU, 1936) ou de la motricité (RAE, 1954 ; BERKE, 1960). Sur le plan ontogénétique, les conceptions sont également très divergentes. Pour les uns, il s'agirait d'un dérivé cortical (BRODMANN, 1909 ; ARIËNS-KAPPERS, 1921 ; SPATZ, 1921 ; M. ROSE, 1928) ; pour d'autres, d'une formation sous-corticale (CAJAL, 1902 ; LANDAU, 1923 ; MACCHI, 1951 ; FILIMONOFF, 1966). En radioautographie, HINDS et ANGEVINE (1965) chez la Souris ne purent arriver à une conclusion sur ce problème. Ils notèrent néanmoins la précocité des neurones de cette formation, en continuité chronologique avec les neurones profonds du cortex insulaire. Pour notre part, nous ne pensons pas que la continuité constitue un argument pour ne pas séparer le claustrum du cortex. Nous reviendrons plus loin sur ce point mais, déjà, nous pouvons affirmer que, dans la plupart des cas, il existe des transitions chronologiques entre les différentes générations cellulaires, fait qui découle du principe de chevauchement des populations. La véritable discordance chronologique reste un phénomène exceptionnel. Or, dans le cas du claustrum, il existe justement une discordance au niveau antérieur (Pl. 29, niveau 3). On remarque qu'au stade 14,5 les neurones se disposent près de la capsule externe dans les îlots du claustrum et que, en direction de la surface, un hiatus les sépare de la couche des neurones corticaux du même stade. Ce hiatus correspond essentiellement aux neurones du stade 13,5. On voit donc que le gradient centrifuge isocortical n'est pas respecté ici. En conclusion, il semble que l'on puisse comparer la séquence du claustrum à ce niveau à la séquence paléostriée. Il n'en

est pas de même postérieurement, où la proportion des neurones anciens augmente considérablement et le gradient devient concordant avec le cortex sus-jacent. La séquence pourrait être comparée à celle de la division antérieure de l'archistriatum, la plus archaïque de tout le striatum.

En résumé, il semble que les parentés avec certaines séquences du striatum soient indiscutables. La discordance très nette au niveau antérieur renforce cette opinion. Mais l'existence d'un gradient centrifuge plus postérieurement montre néanmoins qu'il existe des analogies avec les formations palliales et confirme ainsi la constitution hybride de cette formation.

4 / Septum

Le fait chronoarchitectonique saillant de cette structure est la présence du gradient caudo-rostral. Ce gradient fondamental, que l'on retrouvera généralement dans toutes les structures impaires (c'est-à-dire toutes les vésicules, sauf le télencéphale), était annulé ou inversé dans la plupart des régions télencéphaliques envisagées précédemment, par suite du mouvement de retournement des hémisphères en direction caudale. On trouve aussi dans la région septale un gradient centrifuge très net, organisé autour d'un noyau archaïque (11,5-12,5 j), dont on peut se demander s'il ne doit pas être comparé à l' "axe diencéphalique" paléostrié. L'ontogénie ne laisse rien envisager de tel et, classiquement, il est admis que le septum émane du pallium et de ses dérivés nucléaires. Le paléopallium, pour les uns (M. ROSE, 1926, 1927) ou l'archipallium pour les autres (MACCHI, 1951), donnerait naissance au septum pellucidum, tandis que le reste du complexe septal dériverait de la pars nuclearis du semi-cortex du corps paraterminal. Or, chez le Rat, il n'existe pas de septum pellucidum, ce qui à première vue éliminerait tout apport paléocortical ou archicortical. Cependant, nous avons montré qu'autour du noyau ancien s'or-

ganisait une "écorce" récente, dont la séquence serait d'ailleurs plus proche de celle de l'archicortex et qui serait ainsi l'homologue des composants corticaux septaux des Mammifères supérieurs.

B - Diencephale

1/ Subdivisions générales

Dans le diencephale, HIS (1893) utilisait le sillon limitant pour distinguer une plaque alaire sensorielle d'une plaque basale motrice. Celle-ci correspondait à l'hypothalamus, tandis que la première correspondait au restant du diencephale (épithalamus, thalamus et métathalamus). Cette correspondance fonctionnelle n'est pas vérifiée par les faits et, à cette classification, on préfère généralement celle d'HERRICK (1910) qui divise le diencephale en 4 parties délimitées par les 3 sillons embryonnaires. Il distingue ainsi l'épithalamus, le thalamus dorsal, le thalamus ventral et l'hypothalamus. La terminaison exacte du sillon limitant varie selon les auteurs. Pour HIS et HERRICK, il aboutirait dans la vésicule optique. Pour d'autres, il se terminerait près du repli mamillaire (LE GROS CLARK, 1932 ; KUHLENBECK, 1948). Cette dernière interprétation implique que la totalité du cerveau antérieur soit un dérivé de la plaque alaire. Le seul sillon diencephalique nettement stable ontogénétiquement serait le sillon hypothalamique ; aussi, LE GROS CLARK (1932) ne distingue-t-il fondamentalement que deux divisions, dorsale et ventrale, au diencephale, la séparation entre les 2 étages diencephaliques coïncidant avec une frontière hodologique, précocement différenciée (COOPER, 1950) nommée lame médullaire ventrale par LE GROS CLARK. Nos résultats confirment partiellement cette conception, au moins en ce qui concerne l'unité du diencephale ventral (LE GROS CLARK, 1932 ; KUHLENBECK, 1954 a et b). Il suffit de se reporter aux planches 1

(stades 10,5 et 11,5), 21 et 23 (niveau 6) pour remarquer la netteté exceptionnelle de cette unité sur les radioautogrammes et les cartes.

L'épithalamus (noyau habénulaire) est à séparer très nettement du thalamus. Là aussi, l'iconographie démontre clairement (Pl. 1, Pl. 29 niveau 6) sa discordance chronoarchitectonique par rapport aux couches environnantes. Nous verrons ultérieurement qu'il faudrait peut être envisager une séparation entre les deux noyaux habénulaires.

2/ Hypothalamus

Un travail très récent entrepris par IFFT (1972) sur l'hypothalamus du Rat constitue un des rares points de comparaison que nous puissions trouver pour l'ensemble de nos investigations dans le SNC. La confrontation des résultats montre une bonne similitude si on prend la précaution de tenir compte d'un décalage systématique des séquences, lié aux méthodes différentes de datation des femelles gestantes. Le fait marquant est l'apparition d'un gradient particulier en direction du III^e ventricule et qui, pour l'ensemble de l'hypothalamus, apparaît donc comme centripète. C'est le seul gradient vraiment net et constant en fonction des niveaux. Quant à la séquence d'ensemble de l'hypothalamus, elle s'étend de 11 à 17 jours et s'avère donc aussi longue que dans d'autres structures, comme le thalamus. C'est pourquoi ce critère à lui seul semble insuffisant pour retrouver les données classiques de l'ontogénie et de la phylogénie. Les proportions relatives des différentes couches chronologiques semblent par contre fournir un classement plus sélectif.

3/ Thalamus, sub- et épithalamus

Nous retrouvons pour ces 3 parties du diencéphale le gradient centripète défini dans l'hypothalamus. Il a été décrit chez la Souris (JOHNSTON et

ANGEVINE, 1966 ; ANGEVINE, 1968) et le Rat (BISCONTE et MARTY, 1968). Si l'on se rappelle que toutes les structures dérivent des zones ventriculaires primitives dont nous avons justement signalé la grande uniformité structurale et fonctionnelle, il est difficile *a priori* de comprendre le sens opposé des gradients télencéphalique et diencephalique (ANGEVINE, 1970). Nous proposerons plus loin une explication à cette particularité.

Si l'on considère l'ensemble subthalamus, noyaux réticulaires et pars ventralis du corps genouillé latéral (ces deux dernières parties étant souvent groupées en un thalamus ventral, J. ROSE, 1942), on peut remarquer que la séquence intéresse dans le même ordre ces différentes parties, ce qui correspond à un gradient schématiquement centrifuge. Chronoarchitectoniquement, il est vrai que les différences sont assez faibles pour que cet ensemble soit regroupé (J. ROSE, 1942), mais la remarque est alors valable pour d'autres formations. Ceci conduirait à rassembler ces masses diencephaliques anciennes et des formations antérieures (aire préoptique latérale, amygdale antérieure, pallidum portion ventrale, etc...) ou postérieures (noyau rouge, substance noire, noyaux réticulaires). Ce fait avait déjà été souligné par LE GROS CLARK (1932) qui avait remarqué la continuité de cet axe ancien avec la substance grise tegmentale.

D'autres gradients peuvent être observés dans ces formations, mais ils sont peu marqués et relatifs. Il en est ainsi pour le gradient caudo-rostral, qui aurait tendance à s'inverser à la jonction diencephalo-mésencéphalique par les apports des neurones tectaux récents.

L'étude détaillée des séquences a été entreprise chez le Rat (BISCONTE et MARTY, 1968), le Lapin (noyaux antérieurs thalamiques, FERNANDEZ, 1969), la Souris (ANGEVINE, 1970). Elle montre de grandes analogies, du moins en ce qui concerne la chronologie relative des noyaux thalamiques, seule donnée comparable

du fait qu'il s'agit d'animaux différents. Si on compare la séquence thalamique à celle de l'hypothalamus, on remarque qu'elles sont très voisines. La seule différence semble résider dans l'absence des neurones anciens et archaïques que l'on trouve dans l'axe ancien (essentiellement subthalamique) du diencéphale ventral. En ce qui concerne la fin de la séquence, l'achèvement est simultané et relativement tardif (17 jours), et il intéresse en général les noyaux proches du III^e ventricule. C'est le cas de la partie médiane du noyau habénulaire, qui s'avère donc être chronologiquement très récente et en conséquence bien différente de la partie latérale. Ceci illustre particulièrement bien la difficulté qui existe parfois à faire coïncider les classifications ontogénétiques et phylogénétiques avec les données chronoarchitectoniques. En effet, selon les premières, l'épithalamus est considéré comme une formation ancienne. Il dérive d'un neuromère ancien (III), alors que le thalamus ventral dérive du neuromère II et que le télencéphale, le thalamus ventral et l'hypothalamus dérivent du neuromère I (COGGESHALL, 1964). Phylogénétiquement, il tend à régresser au cours de l'évolution (ROSE et WOOLSEY, 1949). Enfin, des expériences d'ablation montrent sa totale indépendance vis-à-vis du cortex (ROSE et WOOLSEY, 1949). Si la conception d'un épithalamus archaïque paraît ainsi soutenable sur le plan architectonique pour la partie habénulaire latérale, par contre, il y a contradiction absolue à y inclure l'habénula médiane comme le font HERRICK (1910), LE GROS CLARK (1932) et, *a fortiori*, d'autres noyaux comme le complexe paraventriculaire (ROSE et WOOLSEY, 1949). On peut se demander si de telles divergences entre les données classiques et les résultats radioautographiques ne tiennent pas uniquement aux apports en microneurones. Ils constituent la totalité de l'habénula médiane et correspondent vraisemblablement à ce que nous avons découvert dans les îlots de CALLEJA, la massa intercalata et ce qui a été découvert par d'autres auteurs dans le bulbe olfactif et le cervelet. CAJAL

(1911) avait d'ailleurs décrit la parenté entre les "cellules de l'amas interne et les grains du cervelet". On doit noter à ce propos que, dans le diencéphale, il existe des noyaux récents caractérisés par une haute densité de petites cellules, dont on peut se demander si elles sont équivalentes à ces microneurones (noyaux périventriculaires et préoptiques, en particulier). En 1965, DEWULF et al., ont classé les noyaux thalamiques en fonction de leur teneur en microneurones et observé que les noyaux anciens (réticulaires, géniculés, etc...) en possèdent moins (quelques %) que les noyaux récents comme le medialis ou le pulvinar (environ 50 %). Mais, de notre côté, nous n'avons pas observé que ces microneurones thalamiques soient produits après les neurones de taille supérieure. Ce fait signifie qu'il existe tous les intermédiaires entre microneurones anciens et microneurones récents, et constitue à nos yeux une preuve selon laquelle la relation chronoarchitectonique liant l'âge et la taille n'est pas toujours vérifiable. En réalité, s'il est incontestable que, dans un ensemble cellulaire isochronique, on trouve des cellules de toutes tailles, il n'en est pas moins vrai que les isochrones recèlent une proportion de petites cellules d'autant plus élevée qu'ils sont plus récents.

A ce point de la discussion, on peut donc dire qu'il semble exister deux types de microneurones. L'un serait émis (parfois postnatalement) après la fin de production des neurones classiques (de toutes tailles) et aurait tendance à former des ilots ou des couches compactes (habenula médiane ; ilots de CALLEJA ; grains du bulbe olfactif et du cervelet). Les autres microneurones ne diffèreraient des neurones classiques que par leur taille, mais leur nombre serait cependant proportionnellement plus élevé dans les couches plus récentes et ils seraient en conséquence plus ou moins disséminés dans les structures. Pour certains auteurs comme WALKER (1966) les microneurones mélangés dans des noyaux thalamiques spécifiques seraient susceptibles de dégénérer après décor-

tication ce qui tendrait à prouver que leur axone peut être à terminaison corticale comme c'est le cas des macroneurones. Les différences de taille entre macro- et microneurones dépendraient alors de la richesse des connexions synaptiques afférentes à ces cellules (WALKER, 1966). Au contraire pour CARRERAS et al. (1969) après hémidécor-tication les 25 % des cellules qui persistent dans le VB (ventro-basal) sont essentiellement des microneurones. Nos résultats ne sont pas de nature à nous permettre de prendre parti et de décider si à un certain nombre de points communs entre macroneurones et microneurones il faudrait ajouter la possibilité d'impacts axoniques comparables.

A côté des classifications ontogénétiques ou phylogénétiques auxquelles nous nous sommes référées précédemment, il en existe bien d'autres comme les nomenclatures topographiques (WALKER, 1938), hodologiques (MACCHI, 1957), ou anatomo-physiologiques (AJMONE-MARSAN, 1965). Il est intéressant de mettre en parallèle cette dernière nomenclature et nos résultats chronoarchitectoniques. On sait en effet que la physiologie permet la distinction entre systèmes spécifiques et systèmes non spécifiques, et divers auteurs (BISHOP, 1959 ; MARTY, 1962 ; SCHEIBEL et SCHEIBEL, 1966, 1968) se sont posés la question de savoir quel est, au cours de la phylogenèse, la précession d'un système sur l'autre. Dans le thalamus certains groupes cellulaires ne dégénèrent pas après ablation corticale (ROSE et WOOLSEY, 1949 ; KUHLENBECK, 1954 ; RUSSEL, 1955). Ils comprennent le noyau paraventriculaire, les noyaux intralaminaires (centre médian, parafasciculaire, centre latéral, et paracentral) ainsi que les noyaux réticulaires. D'autre part, ces noyaux semblent tous en relation avec la réticulée mésencéphalique. Ces deux arguments sont à la base de la réunion de ces noyaux en un système thalamique non spécifique (MORISON et DEMPSEY, 1942 ; WALKER, 1966) relié au striatum (POWELL et COWAN, 1956) et jouant un rôle important dans l'activité électrique spontanée corticale (MAGOUN et MORUZZI, 1949). Nos

résultats montrent qu'ontogénétiquement ce système non spécifique est hétérogène puisqu'il associe des formations archaïques (noyaux réticulaires) à des structures récentes (noyaux intralaminaires) il est donc probablement erroné de lui faire correspondre un pendant phylogénétique. Cette conception est étayée par des expériences récentes (JONES et POWELL, 1971) qui démontrent que si la majorité des afférences thalamiques somatiques et auditives aboutissent dans les noyaux principaux et intralaminaires du groupe postérieur, aucune n'est envoyée au noyau réticulaire.

C - Mésencéphale

Alors que dans le diencephale le gradient principal est de type centripète ou, plus exactement, latéro-médian, il évolue vers le type centrifuge dans le mésencéphale. Les régions centrales (formation réticulée, noyau rouge et noyaux médians) sont le prolongement de l'axe ancien, que nous avons déjà observé aux niveaux plus antérieurs. Aussi bien en direction dorsale qu'en direction ventrale, on observe un gradient de type centrifuge. La conséquence en est que, symétriquement, les formations du toit ou du plancher (noyau interpédonculaire et aire tegmentale ventrale plus particulièrement) sont les plus récentes. Ce fait n'avait pas été signalé, les travaux précédents de même nature ayant envisagé séparément le tectum de Souris (DELONG et SIDMAN, 1962) ou la zone mésencéphalique basale de Rat (HANAWAY et al., 1971).

Le tectum est caractérisé par un gradient supplémentaire de type rostro-caudal, curieusement inversé par rapport au gradient fondamental. Ce gradient avait déjà été décelé dans le tectum de Poulet (COWAN et al., 1968) à partir d'observations histologiques classiques et radioautographiques (LAVAIL et COWAN, 1971 a et b). En résulte-t-il que le colliculus inférieur soit, sur le plan chronoarchitectonique, plus récent que le colliculus postérieur ? La compari-

son, d'une part, des séquences, et, d'autre part, des proportions en neurones récents incite à répondre par l'affirmative. Il faut cependant remarquer que l'essentiel des apports récents concerne encore une fois des populations de petits neurones (petites cellules étoilées ou fusiformes du noyau, de l'écorce externe et l'écorce internucléaire, CAJAL, 1911), qui sont probablement l'équivalent des grains du noyau habénulaire médian, des ilots de CALLEJA, etc... Ces microneurones étant peut-être doués de caractères physiologiques très particuliers, il est difficile de baser la hiérarchie chronoarchitectonique simplement sur les deux critères que sont la séquence et les proportions relatives des neurones d'âge différent, sans tenir compte de la nature des cellules qui y participent.

Le tectum de Rat comprend classiquement 6 couches (HUBER et CROSBY, 1933) et le gradient profondeur-surface qui le caractérise semble progressif, mais affecté par un chevauchement considérable. Chez le Poulet, LAVAIL et COWAN (1971 b) ont remarqué que le tectum s'équipait en trois vagues, dans l'ordre profondeur-surface, puis zone moyenne. Or, nous avons déjà souligné pour l'isocortex que l'existence de vagues cellulaires, sous-tendues par un fonctionnement discontinu des structures émissives, était improbable. Il en est vraisemblablement ainsi pour toutes les structures que nous avons étudiées, avec une exception cependant : les apports de microneurones. Ces apports s'effectuent souvent de façon discordante du double point topographique et chronologique. L'explication pourrait en résider dans une origine et (ou) une cinétique différente de celle des autres neurones : zones subventriculaire ou sub-épendymaire (et non pas ventriculaire) ; possibilité de prolifération à distance de la zone émissive. Chez les Oiseaux, le tectum présente un développement considérable et se stratifie en 15 couches (CAJAL, 1911 ; COWAN et al., 1961). Il est donc peu comparable à celui du Rat ; cependant, les résultats de LAVAIL et COWAN,

(1971 a et b) sont très proches des nôtres en ce qui concerne les gradients (gradient ventro-latéro, dorso-médian et gradient rostro-caudal). Il est donc difficile d'admettre un mode de fonctionnement très différent des zones émissives d'un animal à l'autre et la différence des résultats entre le Poulet et le Rat est peut être explicable par des variations dans l'apport en microneurones.

La substance grise centrale est affectée par le gradient ventro-dorsal qui, pour être plus précis, est en réalité ventro-latéro, dorso-médian. La conséquence en est que les apports récents sont situés dorsalement au-dessus de l'aqueduc de Sylvius. La substance grise centrale est donc balayée obliquement dans le sens de sa plus grande dimension, ce qui explique la longueur de la séquence chronoarchitectonique qui en résulte (11,5 à 15,5 j).

La zone centrale de la calotte forme un bloc homogène de cellules anciennes et les apports neuroniques d'âge moyen ou récent sont quantitativement peu importants.

La zone basale de la calotte et du plancher a été séparée un peu arbitrairement de la précédente, car la séquence qui la concerne est relativement longue. Il faut remarquer que les neurones les plus récents correspondent encore une fois à des cellules de petite taille de type granulaire (noyau interpédunculaire en particulier). Ce fait a été également observé par HANAWAY et al. (1971).

D - Rhombencéphale

Le pattern d'équipement neuronique qui a été décrit dans le mésencéphale se retrouve au niveau du cerveau postérieur. L'axe ancien coïncide toujours avec les neurones réticulaires bulbaires ou métencéphaliques (noyau teg-

menti pontis). Concentriquement à lui, apparaîtront des neurones de plus en plus récents qui intéresseront successivement les noyaux du pont puis le noyau ventral caudal du lemniscus latéral. Ceci confirme les observations de TABER-PIERCE (1963, 1964, 1965, 1966) qui avait démontré chez la Souris que les noyaux réticulaires (tegmenti pontis) étaient plus anciens que les noyaux du pont.

Dans le bulbe un phénomène analogue explique la différenciation tardive de l'olive bulbaire (ELLENBERGER et al., 1969).

A ces générations d'âge ancien ou moyen succéderont des apports récents sous la forme de microneurones. Apparaissant tout d'abord disséminés ils se concentreront dans les noyaux cochléaires, ce qui confirme les observations de TABER-PIERCE et SWEET (1967) chez la Souris. Ultérieurement, cette production de microneurones gagnera le cortex cérébelleux et sera essentiellement un phénomène postnatal, ayant pour origine la couche granulaire externe (CAJAL, 1911 ; MIALE et SIDMAN, 1961 ; FUJITA, 1967 ; HANAWAY, 1967 ; ALTMAN, 1969 a). Les cellules de PURKYŇE sont produites prénatalement et sont à ranger parmi les cellules d'âge ancien. Ce fait confirme les résultats de TABER-PIERCE et SWEET (1967) chez la Souris et ceux de RAKIC et SIDMAN (1970) chez l'Homme.

E - Conclusions

Les résultats obtenus sont superposables entre eux que l'on s'adresse à divers animaux marqués prénatalement au même stade par une molécule identique ou encore à des rats marqués au même stade mais par des molécules différentes (thymidine ^3H et thymidine ^{14}C). Cette observation illustre la stabilité des patterns chronoarchitectoniques dans le système nerveux central et d'un autre point de vue, elle démontre l'intérêt des radioautographies macroscopiques ^{14}C dont on peut considérer chez l'adulte que le marquage est essentiellement le

fait des neurones. En revanche, ceci n'est pas vrai pour les stades périnataux pour lesquels une proportion importante du marquage est liée aux cellules gliales.

La confrontation de l'ensemble des résultats montre que dans l'ensemble du SNC :

1°/ la production neuronique est un phénomène continu et il n'y a pas lieu d'y distinguer des vagues cellulaires successives. 2°/ Il existe d'une façon systématique une haute interpénétration des différentes générations de neurones. 3°/ Les patterns chronoarchitectoniques varient spatialement mais toujours de façon très progressive. 4°/ Si l'on s'en tient aux séquences chronoarchitectoniques proprement-dites les différences, d'un niveau transversal à l'autre, sont peu significatives au point de vue phylogénétique. Ainsi, certaines cellules corticales sont parmi les plus anciennes, tandis que le cervelet et le tectum comprennent des neurones parmi les plus récents. 5°/ Cette contradiction apparente avec les lois phylogénétiques s'estompe si l'aspect purement séquentiel est complété par des mesures quantitatives (proportions des neurones) et surtout si l'on remarque que les discordances tiennent essentiellement à l'apport de neurones particuliers: les microneurones.

V - LOIS GENERALES DE L'ORGANISATION CHRONOARCHITECTONIQUE

Les résultats radioautographiques ont souligné, au cours de l'analyse régionale, la complexité de l'organisation chronoarchitectonique dans le système nerveux central. Il a cependant été clairement démontré que les neurones ne se disposaient pas d'une façon imprévisible mais, au contraire, obéissaient à des règles vectorielles de hiérarchie chronologique que l'on peut assimiler à des gradients. Ces derniers sont orientés très diversement d'un plan à un autre et, parfois, à l'intérieur d'un même plan, comme c'est le cas pour le gradient centrifuge cortical et le gradient centripète thalamique. Mais, de la même façon qu'un ensemble de couches géologiques peut présenter un sens de stratification opposé d'un versant à l'autre d'un plissement, il n'était pas impossible que certaines discordances puissent s'expliquer par suite des bouleversements morphologiques (courbures, plissements) qui affectent le système nerveux central au cours de l'ontogenèse. Dans cette perspective, à partir des cartes analytiques stratigraphiques (cf. 2^e partie, Pl. 88 à 97), nous avons regroupé les résultats en une représentation tridimensionnelle à partir de laquelle la cohérence du schéma organisateur chronoarchitectonique peut être recherchée. Ce mode de représentation ne pallie que partiellement les inconvénients de l'étude exclusive du système nerveux central selon des plans d'analyse transversaux successifs. En effet, dans une pareille approche analytique, l'importance de la composante transversale des gradients est forcément exagérée par rapport à la composante longitudinale. Inversement, le gradient caudo-rostral serait probablement mieux souligné si les plans analytiques étaient longitudinaux ; en l'absence de ceux-ci, ce gradient a fait l'objet d'une étude photométrique particulière.

Nous avons distingué dans ce chapitre le cas des macroneurones de celui des microneurones et des cellules gliales, et ceci pour deux raisons principales.

La première est que notre étude ontogénétique ne permet qu'une appréciation incomplète de l'histogenèse de ces deux dernières catégories cellulaires, dont la production a lieu en grande partie dans la vie postnatale ; la seconde est que nos résultats régionaux démontrent le comportement particulier de ces cellules du point de vue de la chronoarchitectonie et qu'il existe, en outre, tous les intermédiaires entre la catégorie des macroneurones et celle des microneurones. Aussi, pour terminer, tenterons-nous l'esquisse d'un schéma rendant compte à la fois de la continuité évolutive des zones prolifératives au cours de l'ontogenèse et des différences qui séparent les types cellulaires.

RESULTATS

A - Macroneurones

1/ Gradient caudo-rostral :

Ce gradient est, dans le système nerveux central, l'illustration la plus classique du principe d'hétérochronie selon lequel, aussi bien dans la phylogenèse que dans l'ontogenèse, la naissance et la différenciation ne se déroulent pas simultanément, mais par étapes décalées.

a/ Courbes photométriques (Pl. IV F et Pl. IV G)

Chaque radioautogramme a été traité photométriquement et décomposé en surface d'isodensité. Une valeur photométrique globale, exprimée en unités arbitraires, a été obtenue en multipliant ces surfaces d'isodensité par l'indice qui les caractérise. Une courbe photométrique a été tracée pour chaque cerveau en joignant les valeurs photométriques qui correspondent à 15 plans, répartis régulièrement du bulbe olfactif au cervelet. Sur la planche, une figure a

été réservée pour représenter la valeur moyenne de la section plane du cerveau selon ces 15 niveaux (courbe de surface).

Au stade 10,5 j, il est remarquable de constater le pic de la courbe au niveau caudal et sa décroissance régulière en direction rostrale. L'existence d'une radioactivité au niveau moyen ou rostral ne signifie pas nécessairement, rappelons-le, que les neurones qui sont à l'origine de ce marquage soient contemporains de l'injection. En effet, il s'agit, comme les courbes suivantes le démontrent, de cellules de la 2^e, 3^e et n^{ème} générations consécutives à l'injection. A 11,5 jours, on constate un net déplacement du front au niveau moyen et un déficit au niveau rostral, tandis que caudalement la radioactivité totale reste élevée. Aux stades 12,5 et 13,5 j, la forme de la courbe se rapproche de celle de la courbe de surface, avec un déficit relatif aux niveaux postérieur et antérieur. A 14,5 et 15,5 j, le déficit s'accroît aux niveaux postérieur puis moyen par rapport aux niveaux moyen puis antérieur. Aux stades suivants et jusqu'à 18 jours, le niveau général est en baisse avec des courbes assez plates. Par contre, à 19,5 et 20,5 j, le niveau augmente très sensiblement, fait qui correspond probablement à un phénomène nouveau (émission de microneurones et de cellules gliales). Il est intéressant de noter que ces courbes ont une forme très proche de celle de la courbe de surface, ce qui tendrait à prouver que ce phénomène ne répond pas à une hétérochronie poussée. Ces courbes ont été tracées sans tenir compte du fait que, chez le Rat, le télencéphale recouvre en grande partie les vésicules plus anciennes, et qu'ainsi même en l'absence de gradient net dans les hémisphères, la superposition de structures anciennes et récentes dans un même plan pourrait, dans une certaine mesure, masquer le gradient caudo-rostral général.

Dans une autre série, nous avons tenu compte de cette "anachronie spatiale" et mesuré séparément le télencéphale et les autres structures. Les courbes ne tiennent pas compte de la surface de la section et représentent les indi-

PLANCHE IV F

QUANTIFICATION PHOTOMETRIQUE DU GRADIENT CAUDO-ROSTRAL. I.

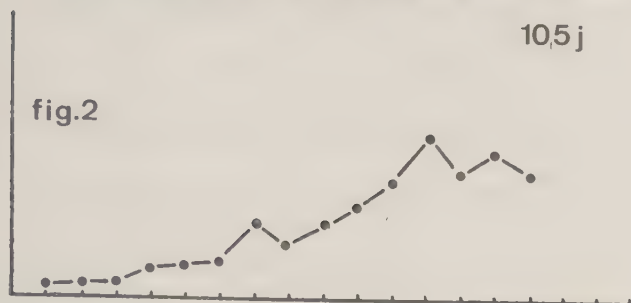
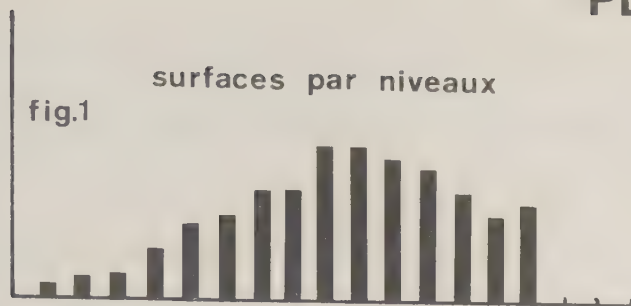
Rats adultes, injection prénatale de thymidine ^{14}C (stades en abscisses pour les figures 2 à 12).

Fig. 1 : Les barres verticales représentent en valeur relative les moyennes des surfaces de coupe mesurées selon les 15 niveaux d'analyses choisis (en abscisses).

Fig. 2 à 12 : Protocole d'établissement des courbes photométriques :

- 1°/ Tous les radioautogrammes sont analysés photométriquement et déposés en surface d'isodensité de noircissement (selon 5 gradations)
- 2°/ Le produit des surfaces par leur indice de gradation est effectué
- 3°/ Chaque niveau est finalement caractérisé par l'addition des valeurs obtenues précédemment.

PL IV.F



ces photométriques maximums trouvés à un niveau déterminé. A 10,5 j, on remarque le marquage intense au niveau rhombencéphalique, modéré au niveau diencéphalique et nul au niveau télencéphalique. A 11,5 j, toutes les vésicules présentent un indice comparable, sauf le télencéphale : toutes possèdent en effet un contingent important de cellules du stade 11,5, alors que le télencéphale n'en possède pas. A 12,5 j, un tel contraste n'existe plus et on note une montée sensible de l'indice photométrique des hémisphères. On peut remarquer qu'il n'existe pas de différence marquée entre le niveau caudal et le niveau rostral des hémisphères, ce qui prouve que le gradient télencéphalique est léger ou absent dans cette direction. A 13,5 et 14,5 j, la courbe télencéphalique rattrape et dépasse par endroits la courbe des autres vésicules, qui montre de son côté de fortes oscillations.

De 15,5 à 17,5 j, les images sont comparables, avec une courbe télencéphalique haute et régulière par rapport à la précédente. Cette dernière montre cependant un pic persistant au niveau caudal, qui correspond à l'émission des microneurones tectaux et cérébelleux. A 19,5 et 20,5 j, l'émission de microneurones change radicalement de niveau pour intéresser le bulbe olfactif, tandis que l'ensemble des structures est caractérisé par un indice maximum comparable.

b/ Courbes photométriques : rats nouveau-nés (Pl. IV H)

Nous venons de voir comment le gradient caudo-rostral pouvait être masqué par les mouvements de recouvrement des différentes vésicules. Ces manifestations peuvent s'exprimer macroscopiquement (retournement des hémisphères) ou microscopiquement (chevauchement des populations neuroniques) et présentent une conformation définitive chez l'adulte. Chez le nouveau-né, l'intrication structurale est moindre, mais l'étude du gradient n'en est pas facilitée pour autant. En effet, un phénomène parasite qui n'existait pas sur les radioautogrammes d'adultes apparaît maintenant. Il s'agit d'un "marquage de fond" d'autant plus accentué que l'injection de thymidine ^{14}C est plus tardive (Pl. 2, 17,5 j). La

PLANCHE IV G

QUANTIFICATION PHOTOMETRIQUE DU GRADIENT CAUDO-ROSTRAL. II.

Fig. 1 : Représentation des différents niveaux d'analyse (Plan 0 et orientation selon l'Atlas de KÖNIG et KLIPPEL, 1963).

Fig. 2 à 12 : Précédemment (Pl. IV F), les points représentaient le produit de l'indice photométrique moyen par la surface de la coupe au niveau considéré. Ici seules sont notées les valeurs maximales de l'indice trouvées à un niveau déterminé pour les hémisphères (points) et le reste d'SNC (étoiles).

PL IV-G

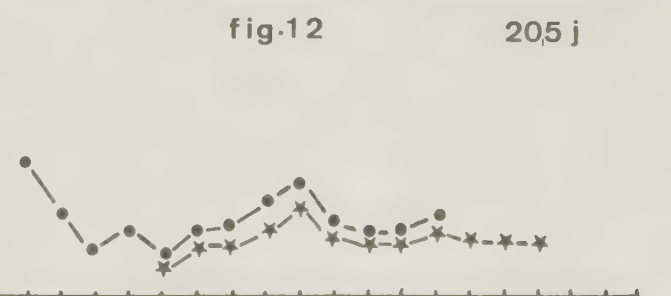
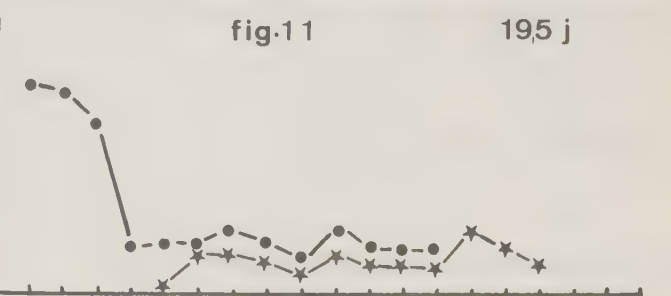
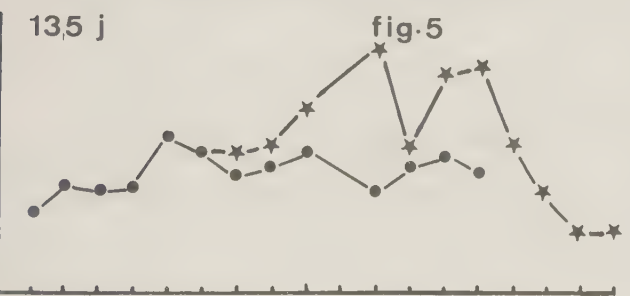
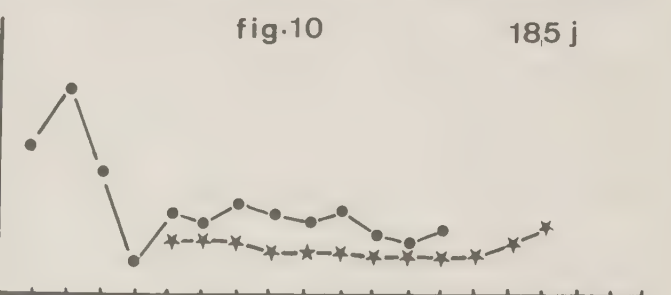
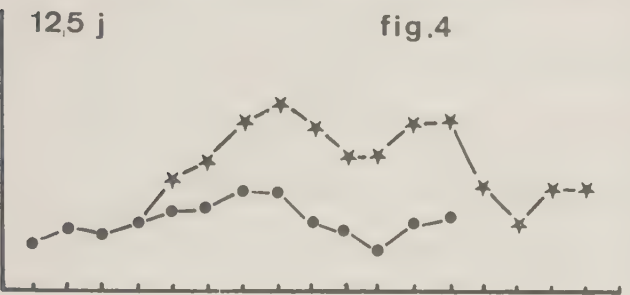
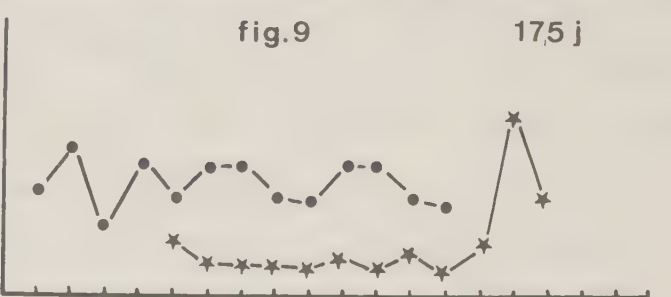
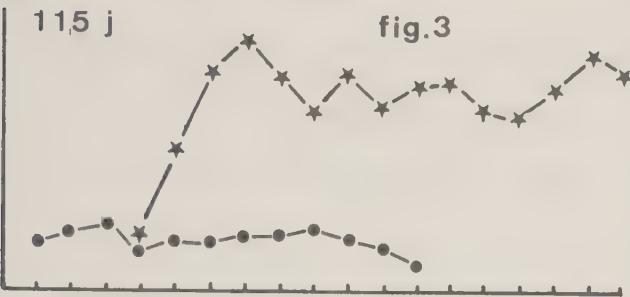
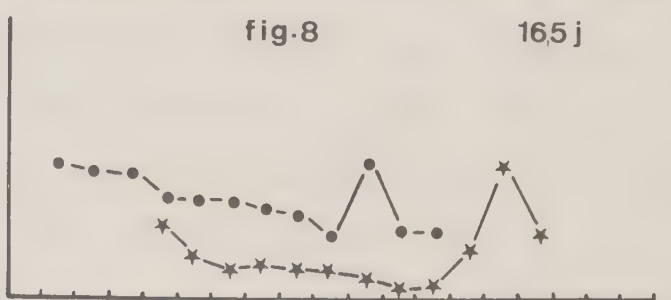
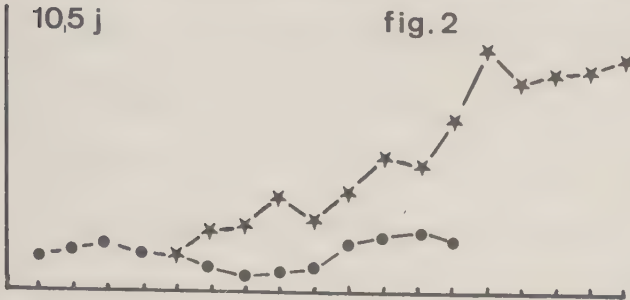
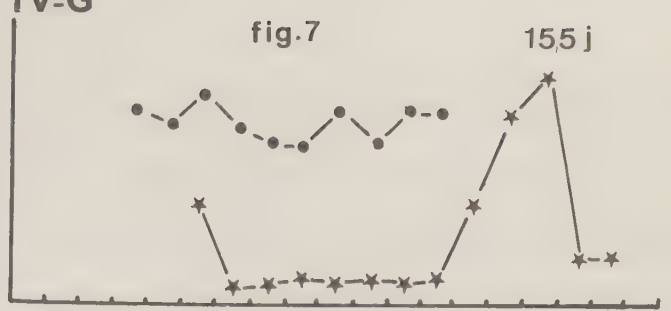
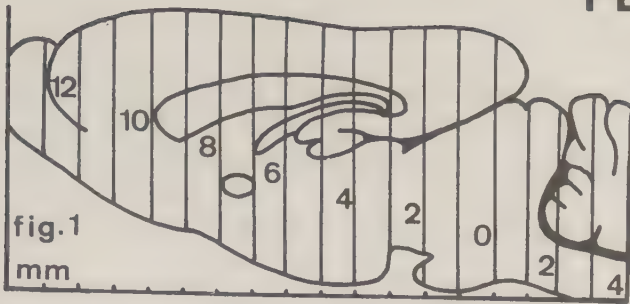


planche IV H montre l'évolution des valeurs photométriques relevées sur 3 zones corticales déterminées. L'interprétation suivante peut en être proposée.

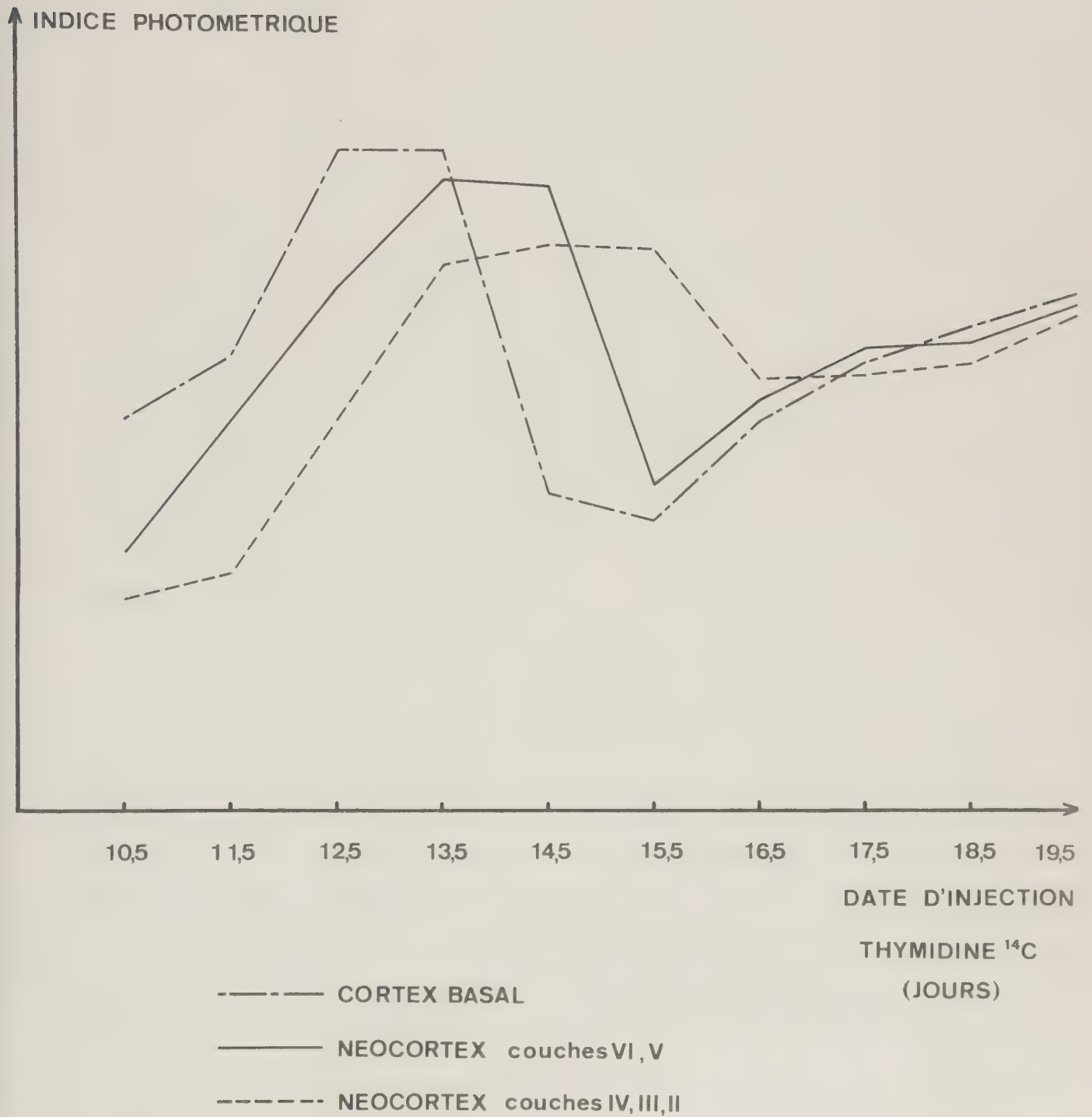
Les 3 courbes (cortex basal, néocortex profond, néocortex superficiel) sont comparables. Elles ne diffèrent que par la position du pic, qui se situe entre 12,5 j et 13,5 j pour le cortex basal, 13,5 et 14,5 j pour le néocortex profond, 13,5 et 15,5 j pour le néocortex superficiel. Le premier segment de ces courbes (en partant de l'origine) est ascendant et reflète la montée du niveau de radioactivité dans les neurones corticaux. Comme ils sont tous d'origine postérieure à l'injection, leur marquage est d'autant plus proche du maximum que le nombre de divisions qui précède leur différenciation est réduit. En conséquence, le second segment de la courbe (maximum) exprime la phase de contemporanéité de l'injection et de la différenciation. Le troisième segment est celui de la décroissance ; il signifie que la région considérée est en voie d'achèvement. Quant au dernier segment, qui ne peut s'observer nettement que périnatalement, il traduit un deuxième apport cellulaire. Il pourrait certes s'agir de neurones récents n'ayant pas achevé leur migration, éventualité qui, d'ailleurs, n'est envisageable que pour le néocortex superficiel. Or, une telle remontée s'observe dans toutes les régions du système nerveux central. Nous pensons donc qu'il s'agit de l'apparition des populations gliales, auxquelles s'ajoutent par endroits des contingents de microneurones. Ces courbes sont en effet en prolongation avec celles obtenues en mesurant la prolifération gliale postnatale dans certaines parties du cerveau antérieur (FULCRAND, BISCONTE et MARTY, 1970).

En résumé, l'analyse photométrique pratiquée sur des radioautogrammes de nouveau-nés démontre la présence de 2 évènements distincts qui interfèrent et rendent impossible l'analyse des gradients à ces stades. En revanche, il est possible de situer chronologiquement l'apparition du second phénomène (essentiellement glial) par rapport au premier (neuronique). Il interviendra au stade 15,5 pour la plupart des régions et 16,5 pour les régions néocorticales superficielles.

PLANCHE IV H

VARIATIONS REGIONALES DE L'INDICE PHOTOMETRIQUE QUAND LA DATE PRENATALE DE
L'INJECTION DE THYMIDINE ^{14}C VARIE.

PL IV-H



c/ Répartition axiale des populations isochroniques

Nous avons montré que les différences portant sur les séquences chronologiques neuroniques étaient peu significatives le long de l'axe du système nerveux central. Le gradient caudo-rostral se manifeste par contre nettement si l'on tient compte des proportions relatives des différentes populations isochroniques. Nous avons représenté graphiquement ces variations (Pl. IV Q) selon 8 niveaux (abscisses), en portant en ordonnées les surfaces des isochrones mesurées sur les cartes de synthèse (Pl. 88 à 97). Cette représentation est très schématique, car elle ne tient pas compte des variations de densité cellulaire et a pour base des résultats déjà approchés. Elle résume cependant clairement les résultats régionaux et montre que le gradient caudo-rostral s'exprime simultanément par l'extension progressive de la séquence et, surtout, par l'inversion progressive des proportions entre neurones anciens et récents au profit de ces derniers. Mais, si cela est vrai pour les macroneurones, les microneurones semblent échapper à cette loi phylogénétique ; la meilleure preuve en est le cervelet, qui présente sans doute la plus forte proportion de microneurones récents de tout le système nerveux central.

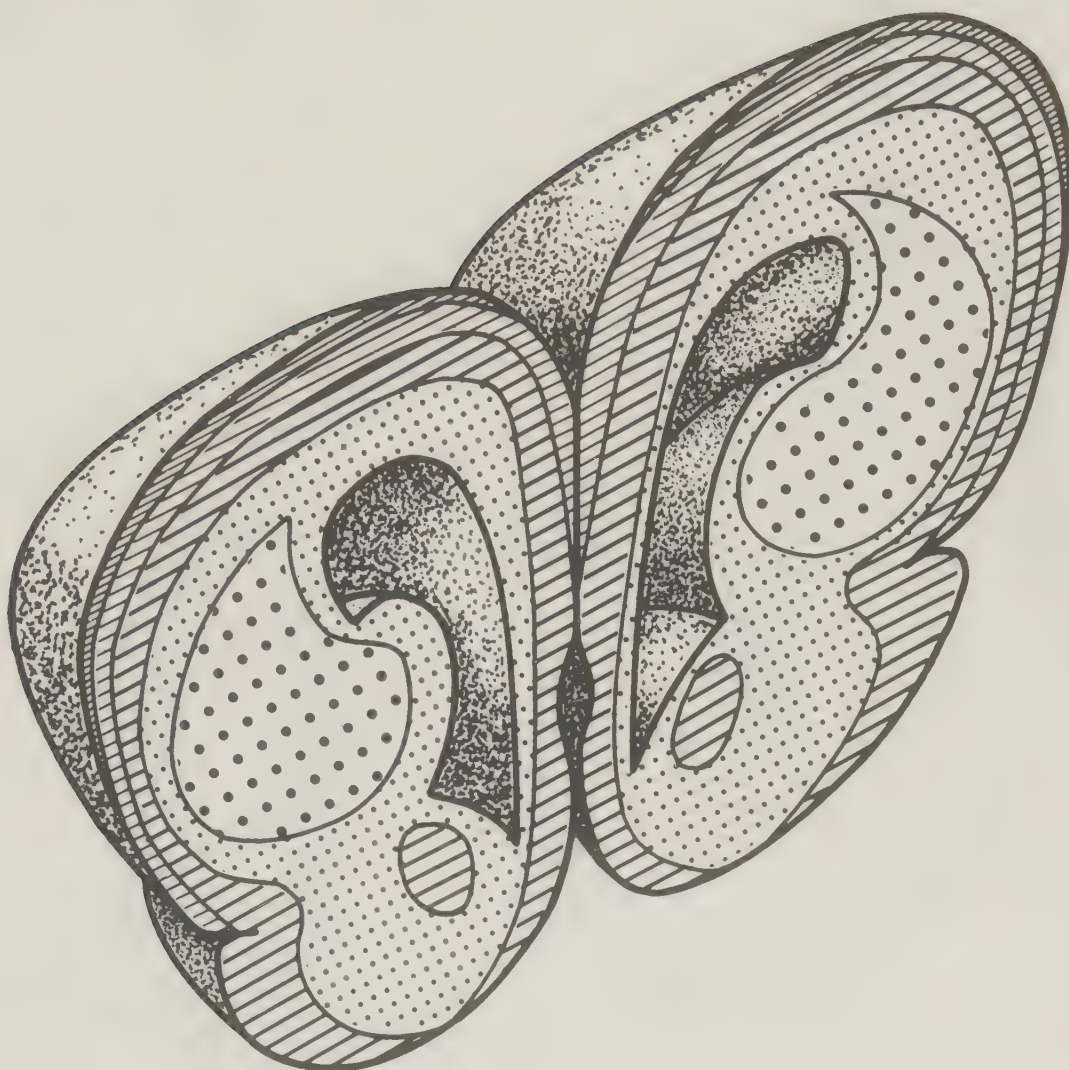
2/ Ensemble des gradients ; lois d'organisation

La représentation tridimensionnelle que nous avons adoptée (Pl. IV I, J, K, L, M, N, O, P) comporte inévitablement une certaine part de schématisation. Par souci de clarté et pour éviter de représenter des bandes isochroniques trop minces, nous avons choisi de regrouper certaines populations neuroniques qui sont soit les plus anciennes, soit les plus récentes et, dans les deux cas, correspondent donc aux phases de production neuronique minimale.

PLANCHES IV I, J, K, L, M, N, O, P

RECONSTRUCTION DES RESULTATS CHRONOARCHITECTONIQUES.

Ces schémas font appel aux résultats radioautographiques obtenus après injection de thymidine ^3H et ^{14}C et qui sont détaillés dans la deuxième partie (Pl. 21 à 97).



11,5 – 12,5 JOURS



13,5 JOURS



14,5 JOURS



15,5 JOURS

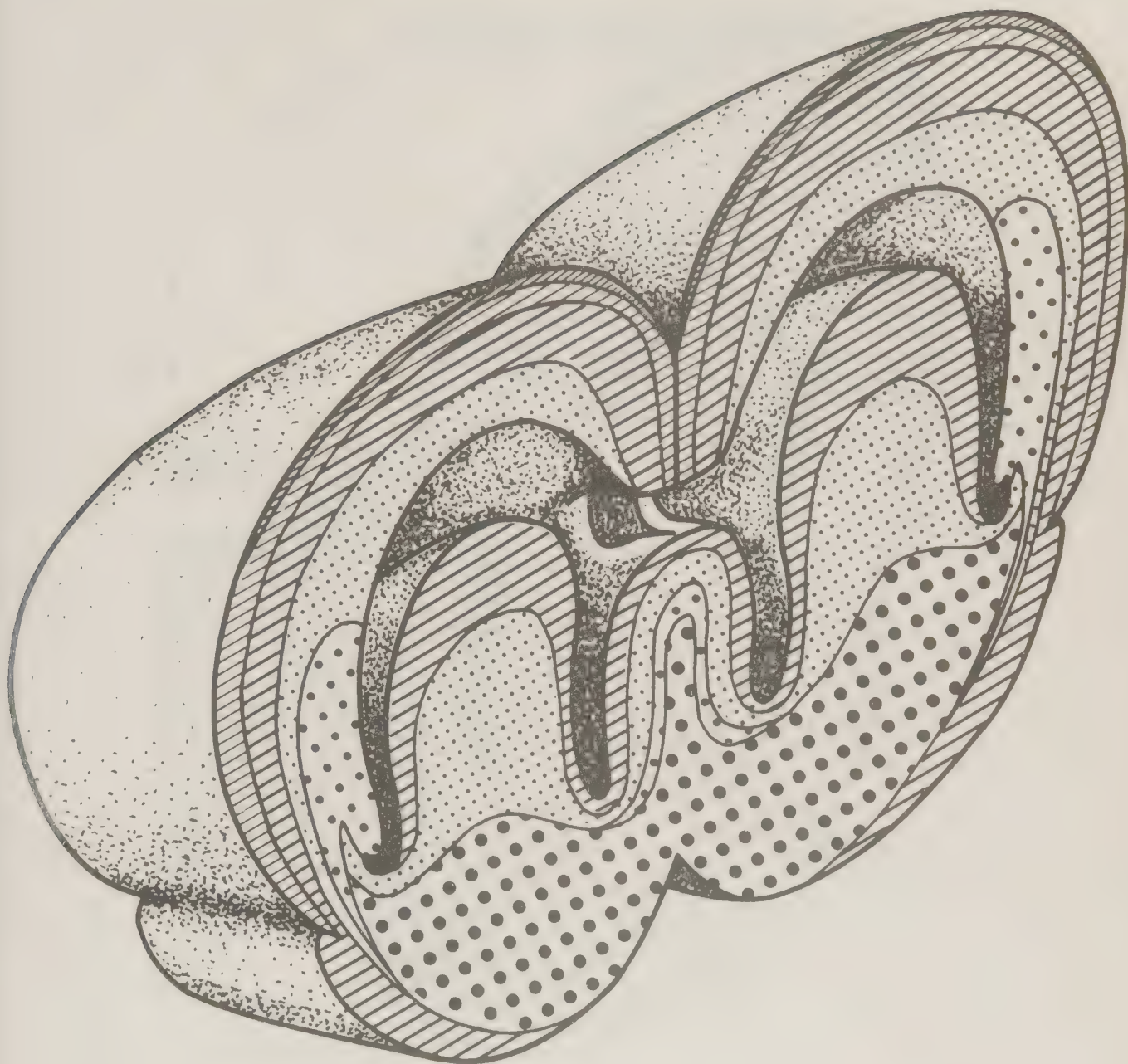


16,5 – 17,5 JOURS

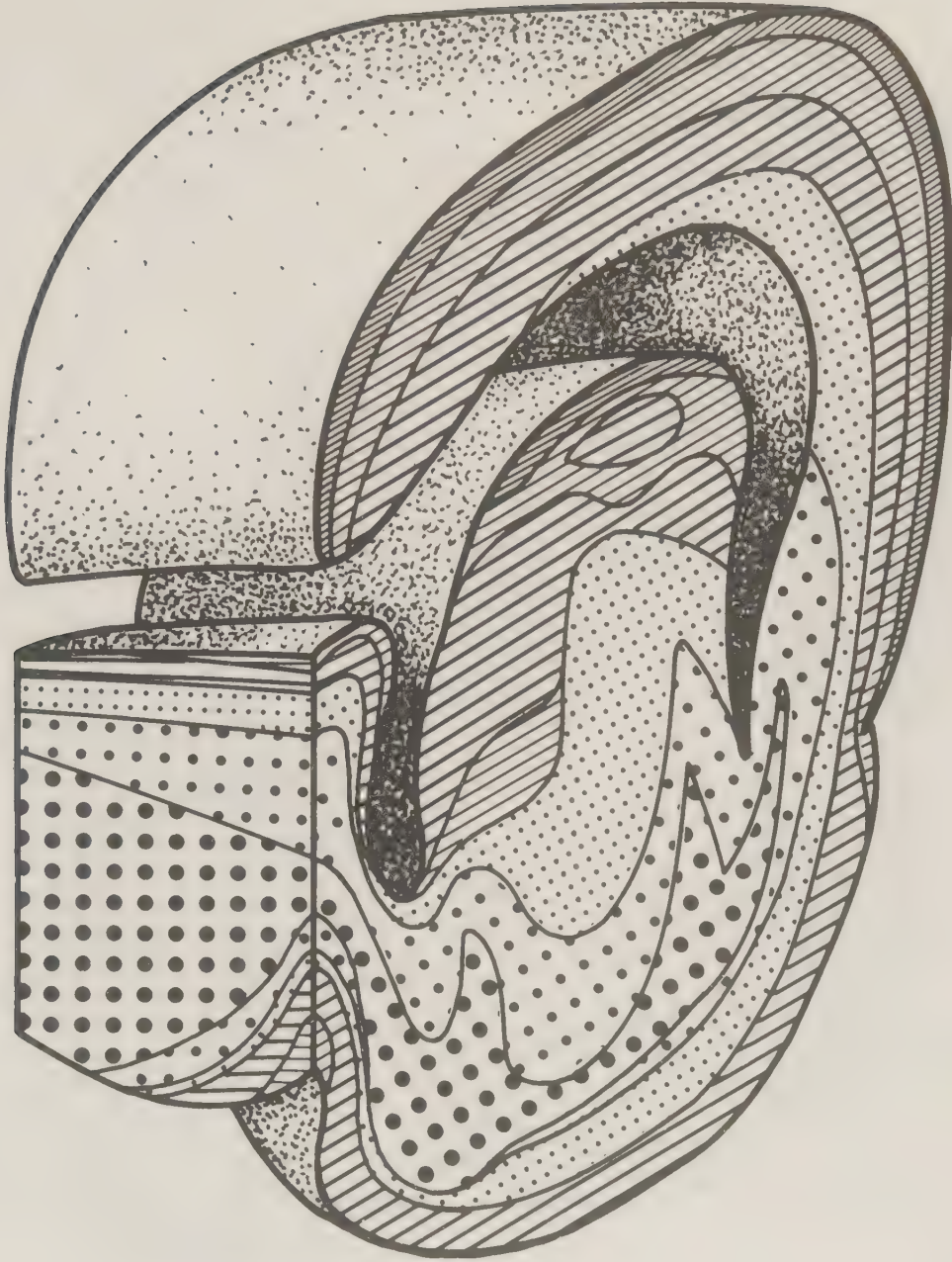


18,5 – 19,5 – 20,5 JOURS

PL IV-J



PL IV.K



11,5 – 12,5 JOURS



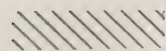
13,5 JOURS



14,5 JOURS



15,5 JOURS

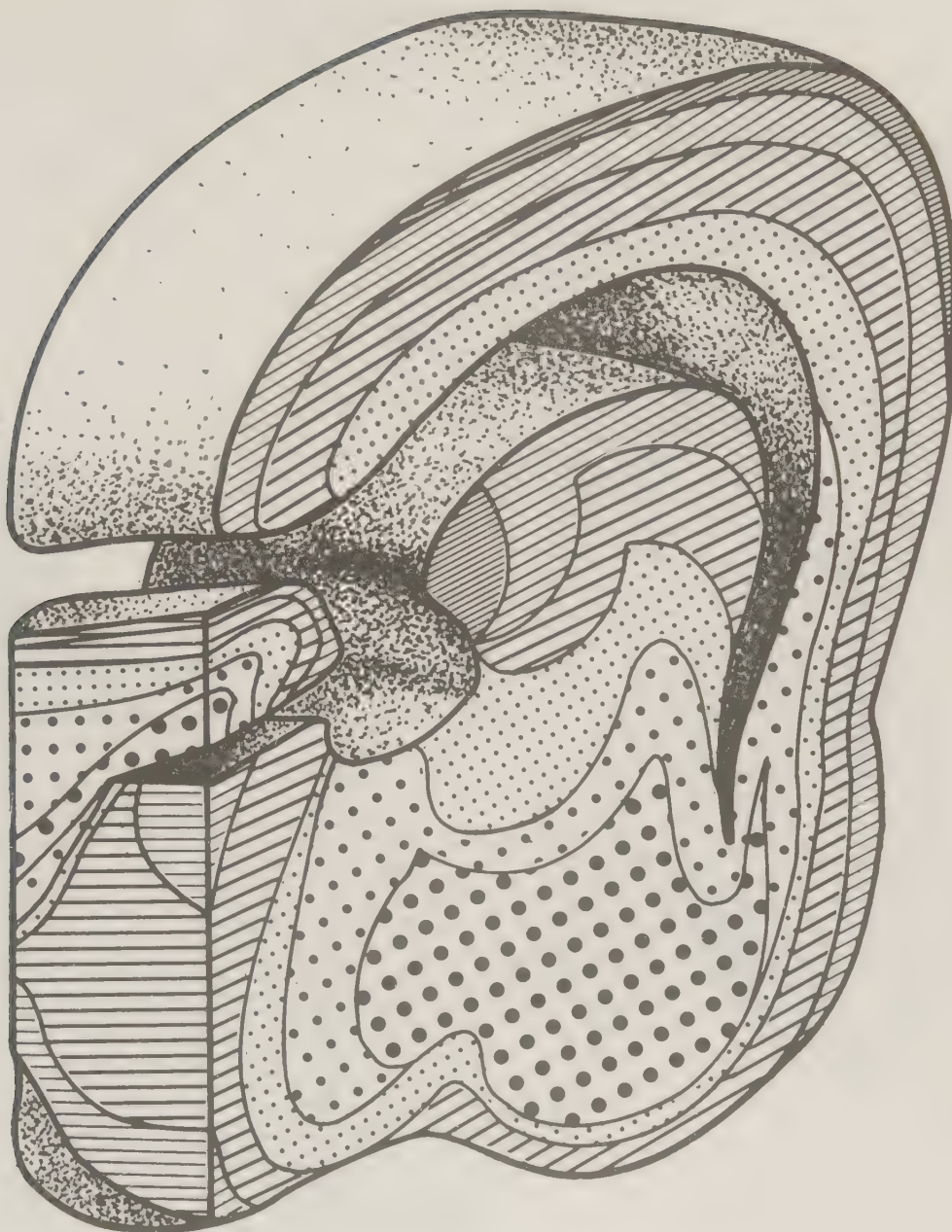


16,5 – 17,5 JOURS

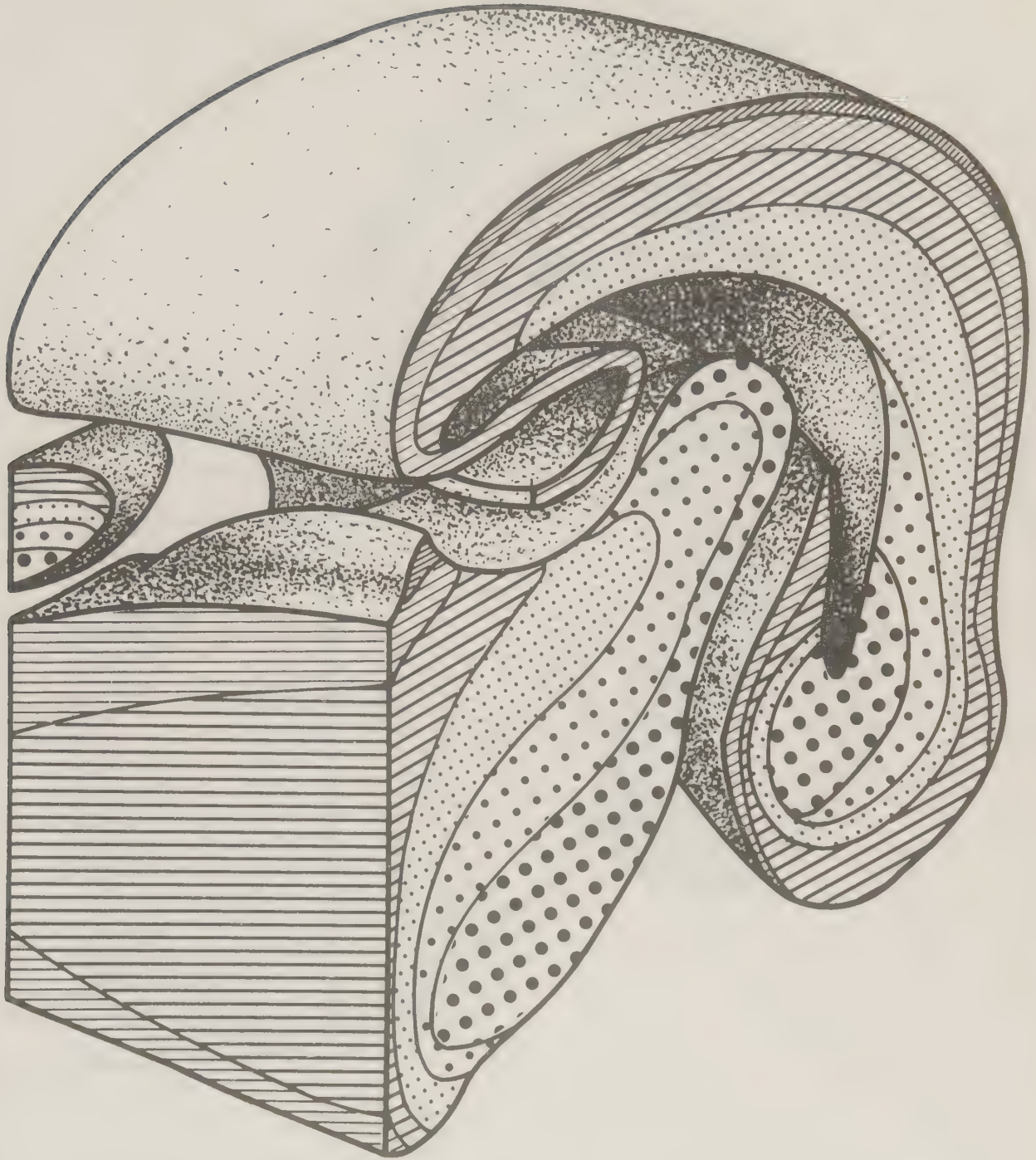


18,5 – 19,5 – 20,5 JOURS

PL IV.L



PL IV.M



11,5 – 12,5 JOURS



13,5 JOURS



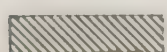
14,5 JOURS



15,5 JOURS

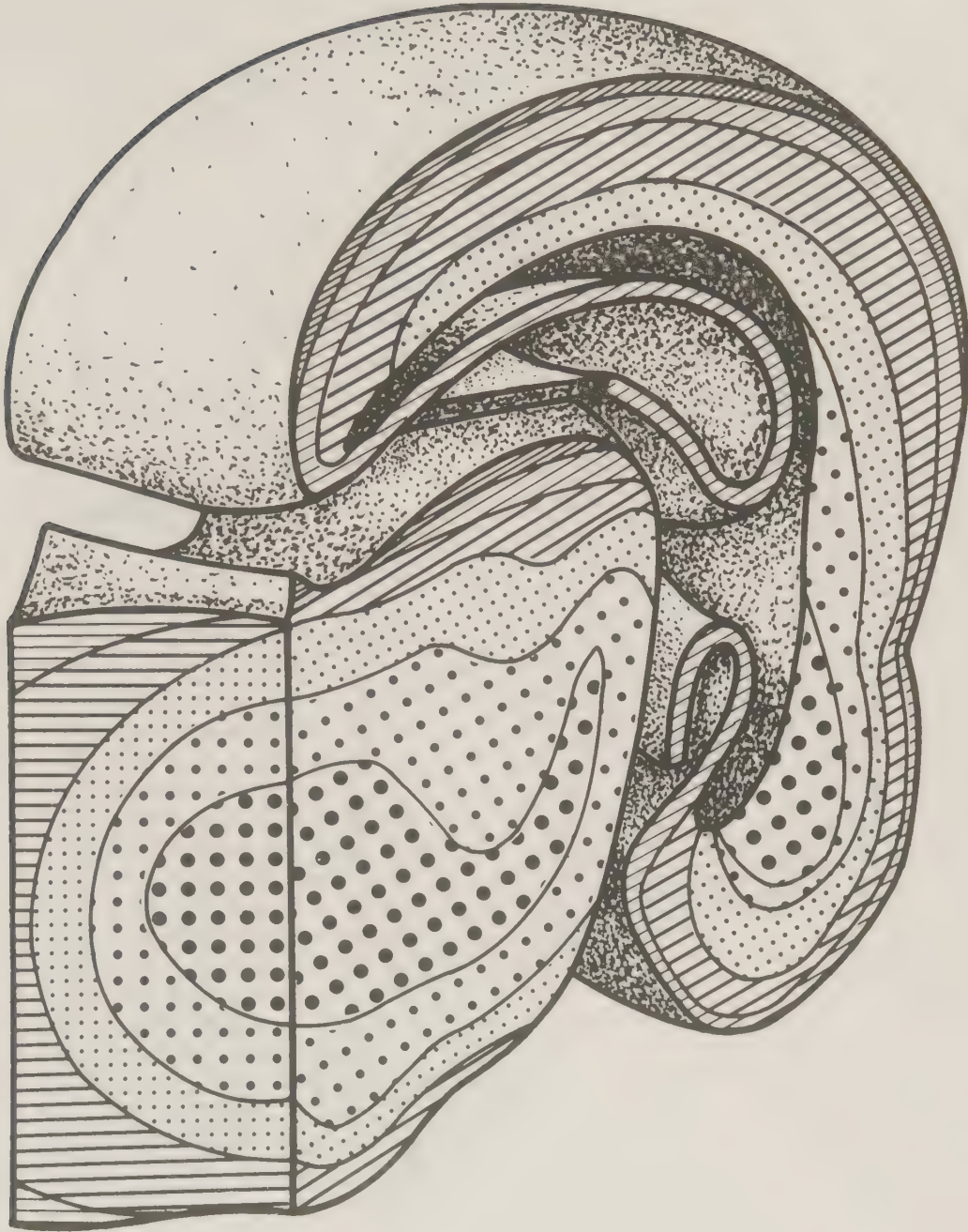


16,5 – 17,5 JOURS

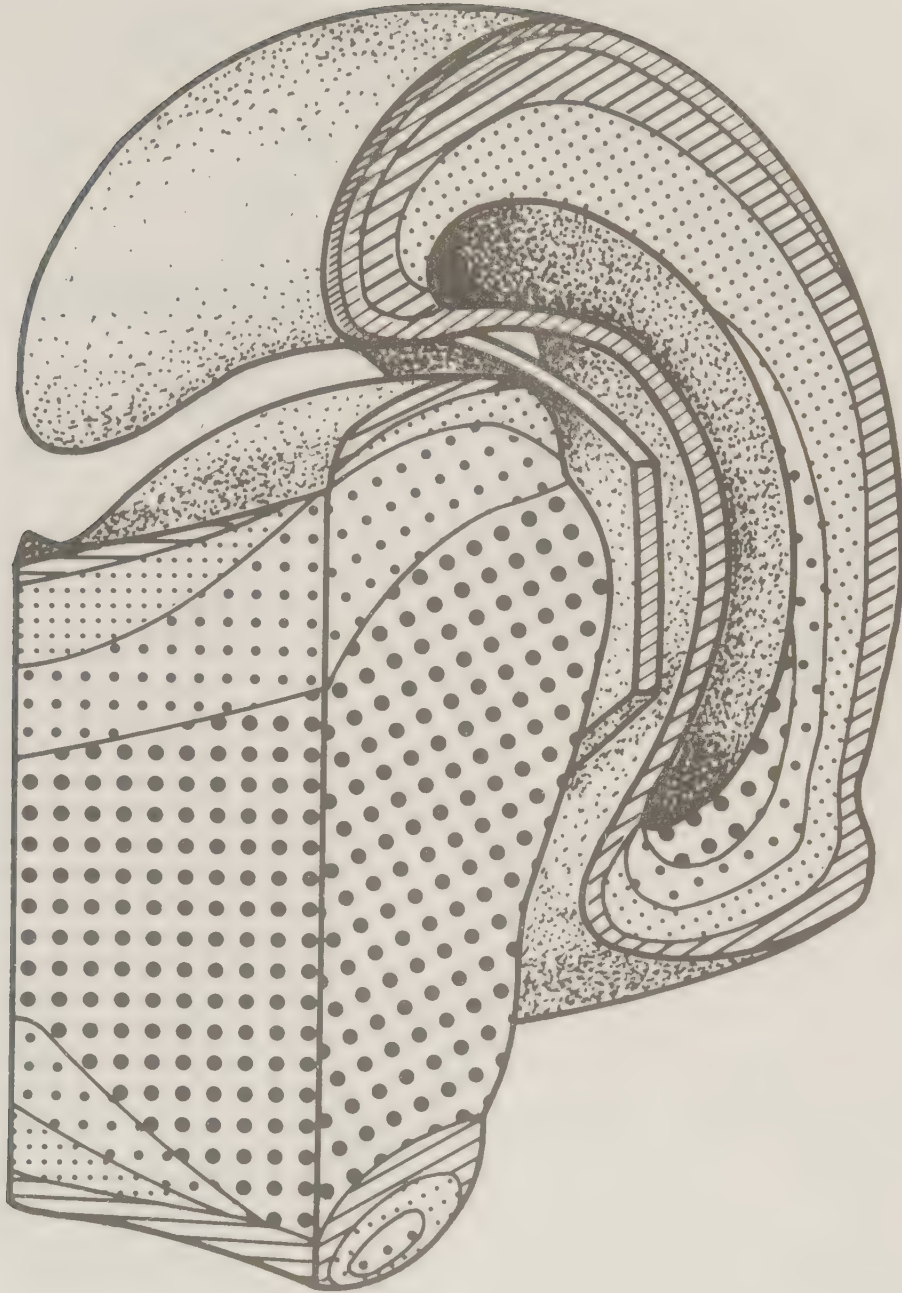


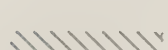
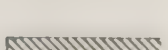
18,5 – 19,5 – 20,5 JOURS

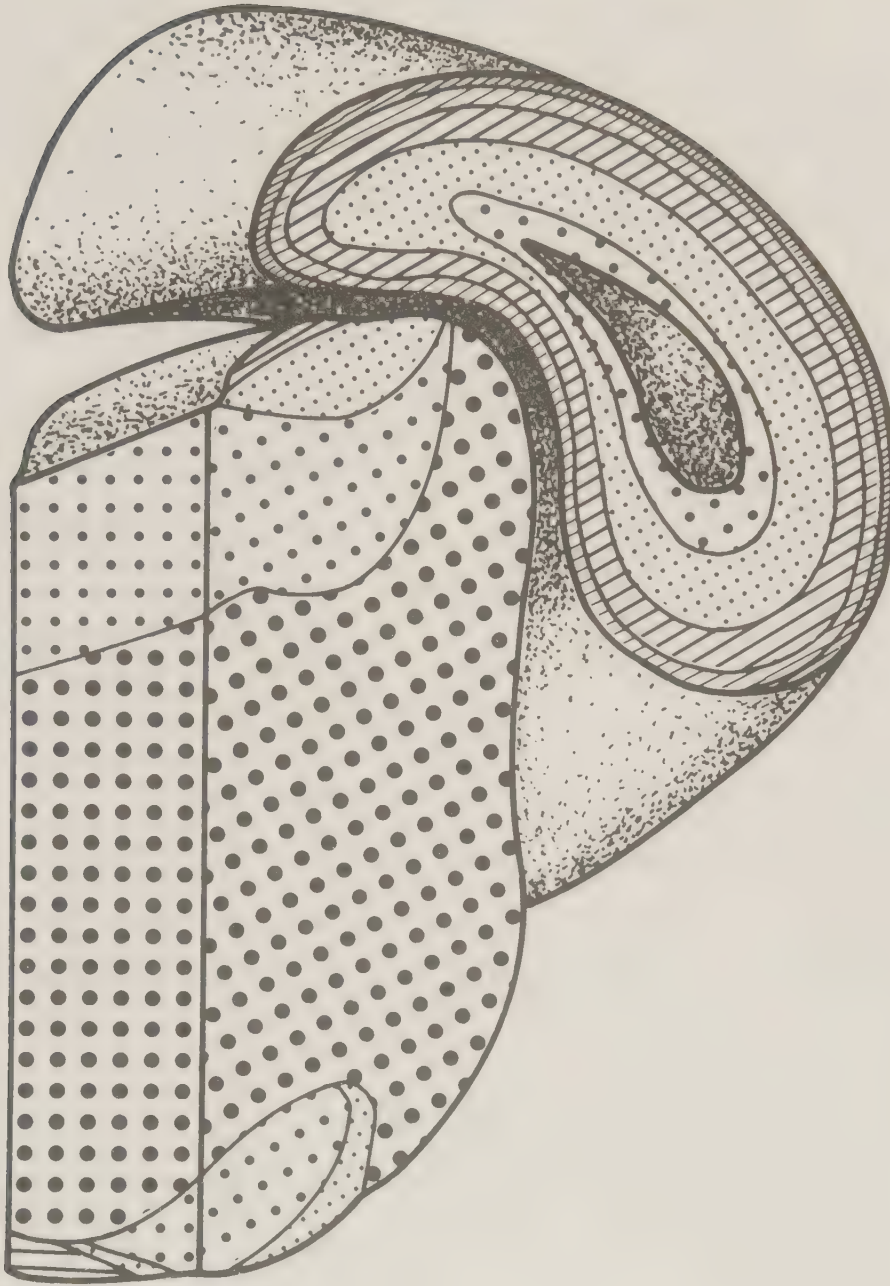
PL IV.N



PL IV.0



- | | |
|---|--------------------------|
|  | 11,5 – 12,5 JOURS |
|  | 13,5 JOURS |
|  | 14,5 JOURS |
|  | 15,5 JOURS |
|  | 16,5 – 17,5 JOURS |
|  | 18,5 – 19,5 – 20,5 JOURS |



a/ Loi de stratification centrifuge

A tous les niveaux, il est clair que les couches récentes s'organisent concentriquement autour des couches anciennes. L'axe ancien qui sert de noyau à la stratification n'est pas réellement cylindrique et se présente plutôt sous la forme d'une lame (Pl. IV P,0). Au niveau thalamique, cette lame s'amincit prend d'abord une forme en V (Pl. IV N) puis, plus antérieurement, se dichotomise (Pl. IV M). Les deux branches s'étalent latéralement et se renflent dans le striatum (pallidum, amygdale) et même dans le cortex (claustrum) (Pl. IV J, Pl. IV K). Rostralement, les deux lames se rapprochent et se soudent pour former l'axe septal ancien (Pl. IV J). On peut remarquer que le dépôt des couches n'est pas isotrope et qu'il s'exprime de façon privilégiée en direction verticale avec une prédominance dans le sens dorsal. Ce fait est très net au niveau antérieur (Pl. IV J), où la lame ancienne affleure ventralement. De la même manière, caudalement, la part prise par les apports plus récents est plus réduite en direction ventrale qu'en direction dorsale. Tout se passe donc comme si le développement ontogénétique et phylogénétique était préférentiellement orienté en direction du milieu extérieur, donc dorsalement. A l'appui de cette observation, on peut remarquer la relative homogénéité des patterns verticaux de stratification, quel que soit le niveau ou la région. A ce point de vue, il y a en effet de grandes similitudes entre le septum, le striatum, le claustrum, le thalamus dorsal et même le tectum. Le télencéphale est *a priori* très différent, mais ses caractéristiques de stratification découlent directement des phénomènes de renflement et d'enroulement qui s'y passent. Il est en effet possible de suivre en parfaite continuité les strates sous-corticales du striatum et du septum et celles du cortex, surtout au niveau rostral (Pl. IV I).

PLANCHE IV Q

EVOLUTION DES SURFACES ISOCHRONIQUES EN FONCTION DES NIVEAUX CAUDO-ROSTRAUX.

Les niveaux correspondent à ceux des cartes Pl. 88 à 97. Les symboles employés correspondent à ceux des planches précédentes.

Fig. 1 : Hémisphères.

Fig. 2 : Télencéphale, diencéphale, mésencéphale moins les hémisphères.

fig. 2

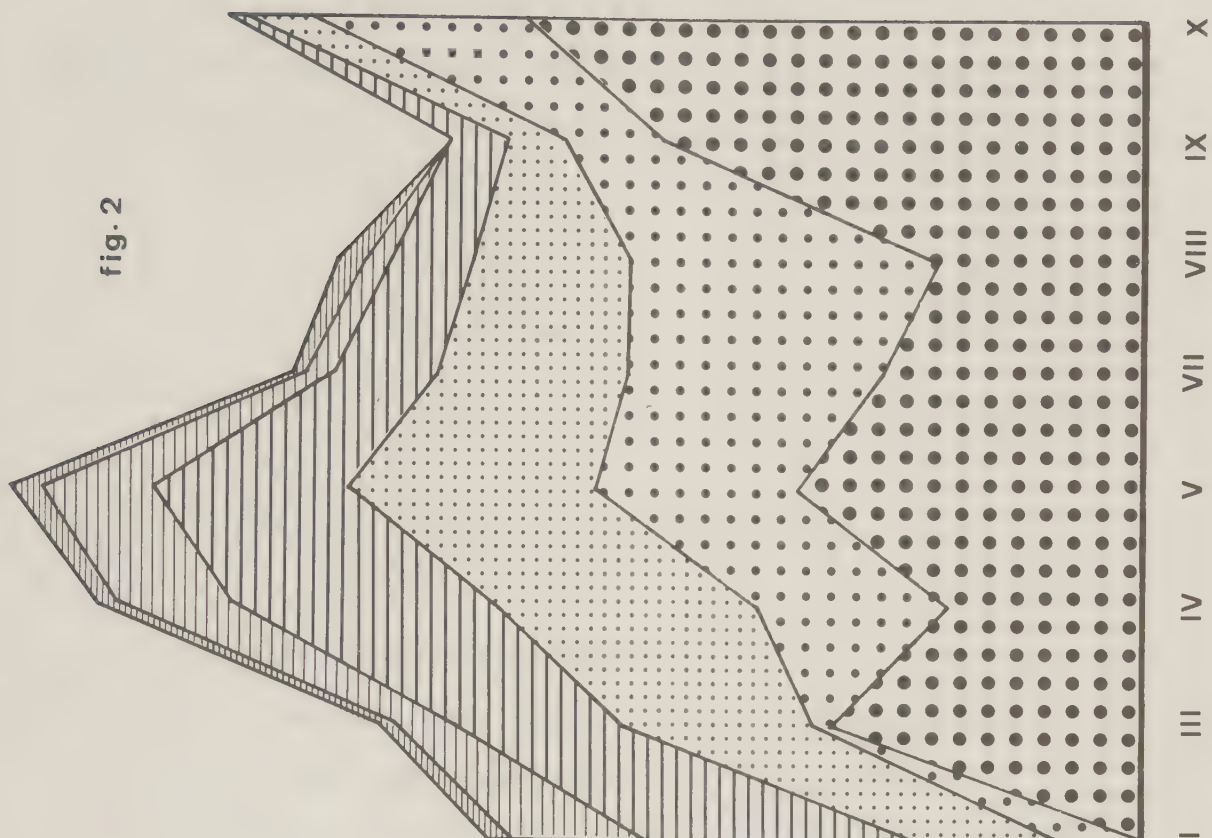
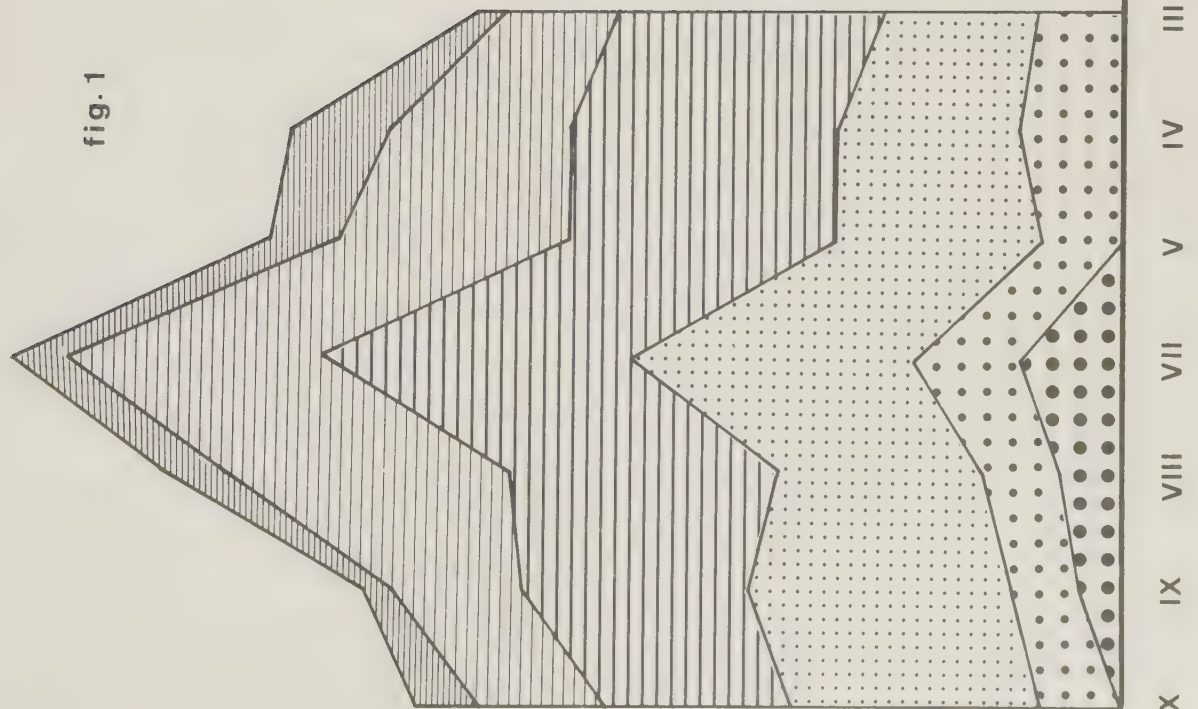


fig. 1



b/ Loi de concordance

Cette continuité, que nous venons d'illustrer dans le télencéphale, s'observe dans toutes les régions. Sa conséquence la plus directe est que les patterns de stratification s'organisent en concordance, c'est-à-dire que les variations chronologiques sont progressives aussi bien dans une direction parallèle à la chronostratigraphie que dans une direction perpendiculaire. Il y a quelques exceptions néanmoins ; elles tiennent pour la plupart aux apports de microneurones, sauf dans le claustrum antérieur et peut-être dans le tectum.

B - Microneurones et cellules gliales

L'appellation de microneurones a été proposée par McLARDY (1963) pour désigner les neurones de petite taille dont l'histogenèse se déroule postnatalement. Ils correspondent morphologiquement aux neurones de Golgi type II (GOLGI, 1886), aux grains (CAJAL, 1911) ou aux interneurones des physiologistes. Or, si la majorité d'entre eux est effectivement d'origine postnatale, il est maintenant évident que la naissance ne constitue nullement une étape privilégiée dans leur apparition et certains, comme ceux de l'habénula médiane (BISCONTE et MARTY, 1968 ; ANGEVINE, 1970), peuvent même se différencier beaucoup plus tôt. Tout au long de l'analyse régionale, nous avons souligné leurs localisations multiples et la diversité de leurs séquences d'apparition, ainsi que la difficulté qu'il peut y avoir dans certains cas à les séparer des autres neurones (cf. thalamus). Néanmoins, quelques traits spécifiques justifient à nos yeux leur distinction en une catégorie particulière et valident le concept de microneurones.

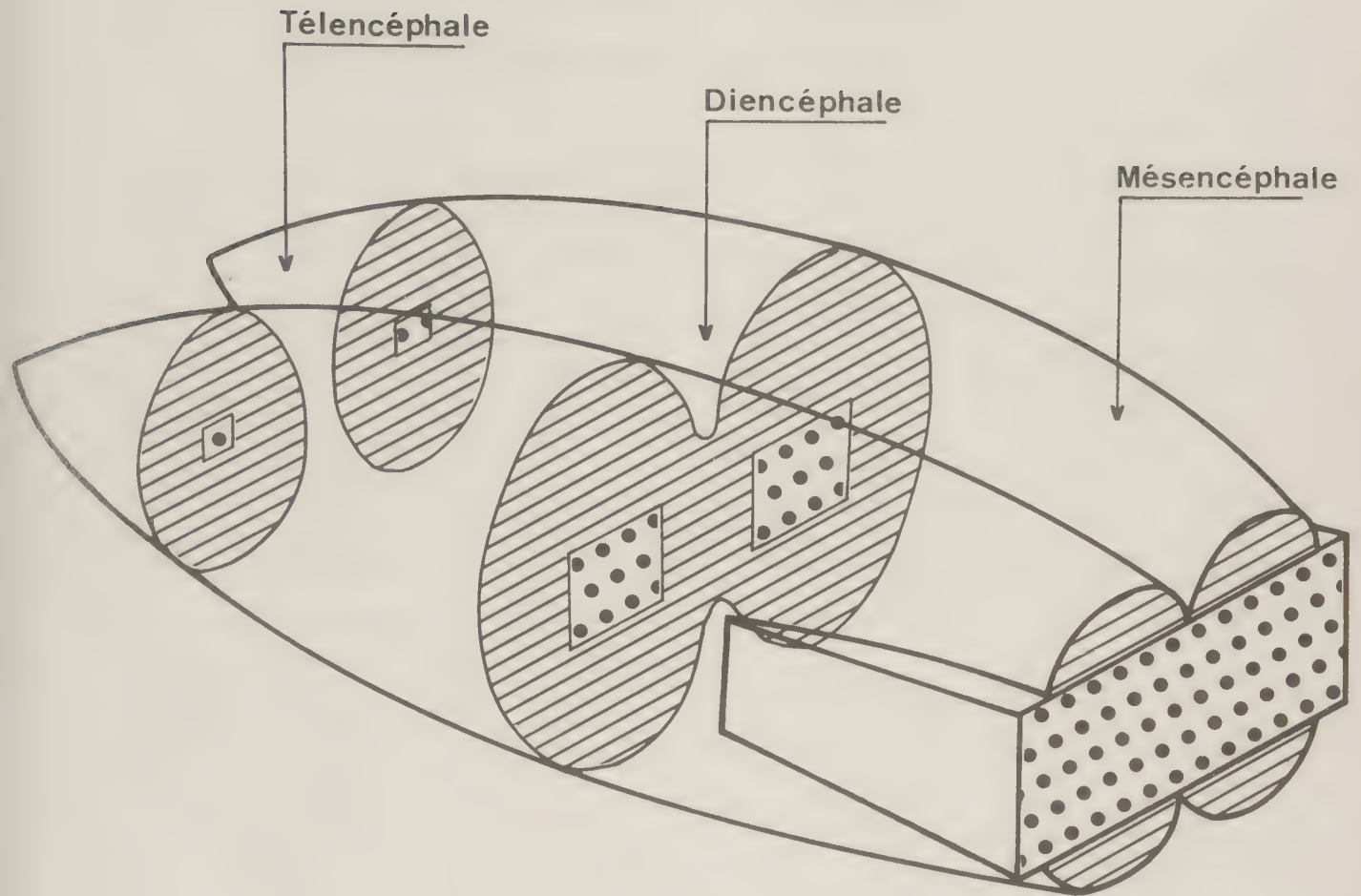
Quant aux cellules gliales, notre protocole ne permettait pas de les observer en détail ; au mieux, pouvait-on faire quelques observations dans les premières phases de leur apparition. Leur groupement avec les microneurones dans ce paragraphe des résultats résulte de l'absence d'éléments suffisants pour les

PLANCHE IV R

L'OI DE STRATIFICATION CENTRIFUGE.

L'encéphale est supposé déroulé. Il montre la dichotomisation progressive de la lame primitive autour de laquelle s'organisent concentriquement les apports neuroniques plus récents. Ce modèle permet d'expliquer l'existence de 3 types de gradients transversaux qui s'expriment nettement au niveau de 3 vésicules, mésencéphale, diencéphale, télencéphale.

PL IV-R



en distinguer, mais exprime aussi certains points de ressemblance que nous avons tenu à souligner.

1/ Caractéristiques spatio-temporelles

Elles sont résumées dans le tableau 5 :

Vésicules	Régions	Age prénatal (jours)											Post-natal
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Télencéphale	bulbe accessoire				14,5		16,5						
	bulbe olfactif							16,5					→
	tubercule olfactif						16,5	17,5					
	îlots de Calleja												
	gyrus dentatus						16,5						→
	massa intercalata				14			17,5					
Diencéphale	épithalamus				14,5			18					
Mésencéphale	tectum					15,5		18					
Métencéphale et Cervelet	noyaux cochléaires					15,5		18					
	cortex cérébelleux							17,5					→

Tableau 5 : Séquences régionales des microneurones

2/ Classification des régions contenant des microneurones

Dans le tableau 5 ne sont mentionnées que les régions dans lesquelles les apports massifs de microneurones se traduisent par la formation de couches ou d'îlots homogènes et denses. A côté d'elles, il existe des régions dans lesquelles les microneurones sont plus ou moins mélangés aux macroneurones. C'est le cas des zones frontalières qui bordent les couches ou les îlots. Leur extension peut être très limitée, comme c'est le cas autour de la massa intercalata, ou au contraire considérable ; c'est le cas du tectum. Il existe enfin une troisième catégorie de régions qui ne peuvent être qualifiées de frontalières, car elles ne bordent pas de couches denses. Il en est ainsi pour les régions périventriculaires stellato-cellulaires, le noyau suprachiasmatique, le noyau arqué (hypothalamus) dans le diencéphale et pour le noyau interpédonculaire dans le mésencéphale. Dans ces zones mixtes, on n'assiste pas à la ségrégation des microneurones en blocs denses, du fait de la présence de macroneurones et peut-être aussi d'un type particulier de neuropile, responsables d'une certaine dispersion. On remarque cependant que, dans le sens du gradient chronologique, la proportion entre macroneurones et microneurones évolue au bénéfice de ces derniers. La formation des couches denses ou des îlots peut donc se concevoir logiquement comme l'aboutissement d'un tel processus. Il y a donc toutes les raisons de penser que l'évolution de la proportion relative macroneurones/microneurones obéit à une loi continue, que l'on pourrait schématiser ainsi :

Macroneurones		Microneurones	
Amas de macroneurones	zones mixtes	zones frontalières	amas de microneurones

Au départ, dans cette perspective, les couches les plus anciennes ne comprennent pas (ou très peu) de microneurones et ceci est particulièrement vrai pour la formation réticulaire dans son ensemble (CAJAL, 1911 ; SCHEIBEL et SCHEIBEL, 1958 ; VALVERDE, 1961). Par la suite, les microneurones apparaissent en nombre progressivement croissant, mais la formation des amas denses caractéristiques n'intervient que vers 14-15 jours quel que soit le niveau caudo-rostral considéré (cf. tableau 5). Les apports massifs cesseront vers 17,5-18 jours, là aussi indépendamment du niveau. Les apports qui débutent plus tardivement (17,5-18 j) se poursuivront jusqu'à la naissance et au-delà. Il semble donc exister une relation entre le début de la séquence et sa longueur.

3/ Relations avec les lois chronoarchitectoniques

Dans la discussion sur le thalamus, nous avons souligné le cas des petits neurones thalamiques qui, produits en même temps que les macroneurones, se trouvent disséminés parmi eux et obéissent aux mêmes règles chronoarchitectoniques. En fait, cette observation peut être étendue à de nombreuses structures comme le cortex cérébral et le tectum, où les microneurones ne se distinguent que par leurs dimensions. En revanche dans les amas, le gradient, qui est parfois en concordance dans les zones frontalières, s'atténue (habénula, tectum) ou disparaît (massa intercalata) ou bien encore s'inverse (cortex cérébelleux).

A ce point de vue, il faudrait peut être distinguer parmi les microneurones ceux qui conservent cette concordance de ceux qui la perdent, ce qui revient finalement à séparer les zones frontalières ou mixtes des amas denses. On doit remarquer que cette indépendance vis-à-vis des lois chronoarchitectoniques est également partagée par les cellules gliales.

4/ Relations entre microneurones et cellules gliales

Un parallèle certain existe entre le moment d'origine des microneurones et celui des éléments névrogliques (ou de leurs précurseurs). Les premiers ap-

paraissent vers 14-15 jours dans les amas, alors que les seconds commencent à proliférer vers 15-16 jours. Un autre point de ressemblance réside dans la taille et la morphologie, fait qui est à l'origine de la difficulté de séparer les cellules gliales des microneurones lorsque ceux-ci se trouvent disséminés dans la structure et il en résulte qu'à l'heure actuelle la microneurogenèse isocorticale (ALTMAN, 1970) n'est pas réellement démontrée. La migration amiboïde, qui semble prouvée -au moins pour les neurones cérébelleux (RAKIC, 1971)- constitue aussi une propriété commune aux deux types cellulaires. Cependant, les cellules gliales utilisent également le mode de migration entre deux prolongements cytoplasmiques ancrés sur les limitantes interne et externe (CAJAL, 1911).

5/ Hypothèse phylogénétique

L'épithalamus, structure phylogénétiquement la plus ancienne du diencéphale, est composée en grande partie de microneurones récents. Il en est de même pour l'amygdale et les neurones récents de la massa intercalata ainsi que pour le tectum et l'invasion de microneurones survenant dans le colliculus inférieur. Au cours de l'analyse régionale, nous avons souligné ce fait paradoxal, qui non seulement semble ignorer les lois phylogénétiques mais qui plus est, paraît évoluer à contre-courant. En effet, les amas denses, apparemment, se placent préférentiellement tout contre (habénula) ou à l'intérieur même (amygdale) des formations les plus anciennes. D'un autre côté, les apports en microneurones sont quantitativement les plus importants au niveau du cervelet (RAKIC, 1970). Ils sont considérables dans le tectum et semblent en décroissance dans le diencéphale et le télencéphale, à l'exception du bulbe olfactif où leur manifestation est aussi très importante. On peut enfin remarquer que le néocortex échappe à cet apport. Cet ensemble de remarques nous incite à formuler l'hypothèse selon laquelle les microneurones pourraient jouer un rôle dans l'adaptation fonctionnelle des structures phylogénétiquement anciennes. Celles-

ci pourraient, grâce à ces apports, adapter leurs diverses connexions au développement rostral du cerveau (télencéphalisation puis néocorticalisation).

C - Schéma général de l'histogenèse dans le système nerveux central

1/ Caractéristiques cellulaires : aspects morphologiques et cinétiques

Dans le tableau 6, nous avons présenté de façon comparée les caractéristiques morphologiques et cinétiques des macroneurones, microneurones et cellules gliales. Pour l'essentiel, ces données sont un rappel de nos résultats, mais elles sont complétées en ce qui concerne les dimensions cellulaires par les observations classiques de CAJAL (1911). Cet auteur avait en outre bien décrit certains mécanismes de la migration, mais ceux-ci viennent très récemment d'être réexaminés (MOREST, 1970 ; RAKIC, 1971). En ce qui concerne les phénomènes gliaux postnataux, nous nous référons à CAJAL et à certains travaux personnels non exposés dans cette étude (FULCRAND, BISCONTE et MARTY, 1969). De la lecture de ce tableau, il ressort que les microneurones présentent beaucoup de caractères intermédiaires entre les macroneurones et les cellules gliales, et cela d'autant plus que leur différenciation est tardive. La variabilité des propriétés de ces cellules pourrait être un argument en faveur d'une origine commune des cellules gliales et des microneurones à partir de cellules indifférenciées, l'orientation vers un type ou l'autre s'opérant en réponse à des sollicitations du milieu (induction). Mais, d'un autre côté, les microneurones peuvent tout aussi valablement être rattachés aux macroneurones. Un schéma synthétique de l'histogenèse dans le système nerveux central devra donc tenir compte de ces particularités.

Type cellulaire	Séquence d'apparition	Taille	Migration	Loi de stratification	Gradient	Accord avec les lois chronoarchitectoniques	Prolifération <i>in situ</i>
Macroneurones	— 1 —	+++	entre 2 prolongements fixés (limitantes interne et externe)	Stratification avec chevauchement	centrifuge	+ + +	non
Microneurones							
A zones mixtes	—	++	> idem	idem	idem	+ + +	> non
zones frontalières	—	+		idem (-)	idem (-)	+ +	
amas denses prénataux	—	+	?	amas ou couches ou parfois dispersé	idem (-) ou nul	+ o -	?
amas denses postnataux	—	+	amiboïde parfois		centripète	-	probable
Cellules gliales	— 5 —	+	entre prolongements + amiboïde	souvent dispersé	variable ou nul	o ?	oui

Tableau 6 : Comparaison de quelques caractéristiques des types cellulaires fondamentaux.

2/ Schéma de l'histogenèse dans le système nerveux central

Nous avons distingué 5 stades fondamentaux (A, B, C, D, E) dans l'histogenèse pré- et postnatale du système nerveux central. Le schéma proposé recoupe les conceptions de FUJITA (1965) pour les stades prénataux et celles d'ALTMAN (1970) pour les stades postnataux. Cependant, en gardant les mêmes indices pour les stades prénataux et certains stades postnataux, nous avons voulu montrer qu'il n'était pas justifié de considérer la naissance comme un événement déterminant pour le fonctionnement des structures émissives. En outre, le fait de grouper deux par deux les types cellulaires produits peut soit exprimer une bipotentialité au niveau d'une cellule mère, soit une certaine hétérogénéité à un même niveau des zones émissives (cf. discussion). Le tableau 7 résume ce schéma.

3/ Chronologie et différenciation cellulaire

Le déroulement de l'histogenèse dans le système nerveux central suivant 5 phases séquentielles implique que l'évolution des zones prolifératives obéit à un programme génétiquement préfixé. Cependant, le passage d'une phase à l'autre peut se concevoir comme le résultat d'un ordre interne ou, au contraire, comme la réponse à une sollicitation externe. Il est également possible d'envisager l'action combinée de facteurs internes et externes.

a/ Facteurs internes

Cette hypothèse (hypothèse 1, tableau 8) postule l'existence d'une origine dans le temps de la séquence (T_0). Elle pourrait correspondre au cours de l'embryogenèse à l'induction du neuroectoderme, mais aussi à des phases situées plus précocement ou plus tardivement. Le passage d'une phase à l'autre (A, B, C,...) pourrait être plus précisément sous la dépendance du nombre de divisions à partir de T_0 . Or, le cycle génératif variant au cours du temps, des séquences homologues dureront plus longtemps rostralement que caudalement ; c'est ce que l'on observe généralement.

PRENATAL					POSTNATAL				
ZONES VENTRICULAIRES									
A	B	C	D	E					
Cellules ventriculaires	Cellules ventriculaires								
Macroneurones	Macroneurones	Macroneurones	Cellules gliales	Cellules gliales					
				cellules épendymaires					
ZONES SUB - VENTRICULAIRES									
		C	D	E					
	Macroneurones	Macroneurones	Cellules gliales	Cellules gliales					
	Macroneurones	Cellules gliales	Cellules gliales	Cellules épendymaires					
ZONES SUB - PIALES									
			D	E					
	Macroneurones	Cellules gliales	Cellules gliales	Cellules gliales					
PROLIFERATION NON ZONALE									
			D	E					
	Macroneurones	(?)	Cellules gliales	Cellules gliales					

Tableau 7 : Schéma de l'histogenèse dans le système nerveux central.

Cette hypothèse peut également rendre compte de la variabilité des zones prolifératives observées à un même niveau (production par des cellules mères voisines de cellules filles de types différents). Les causes pourraient tenir à des variations cellulaires individuelles de T_0 , du cycle génératif ou encore du programme génétique.

b/ Facteurs externes

L'hypothèse d'un asservissement de la production cellulaire à des facteurs uniquement internes n'est pas soutenable. Entre autres arguments, la réalité de l'hétérochronie du développement montre que l'origine dans le temps des séquences (T_0) ne peut être identique pour toutes les cellules et ce fait pourrait s'expliquer par l'action progressante d'un facteur inductif externe. Les facteurs externes pourraient agir beaucoup plus largement et retentir directement sur la différenciation cellulaire. Cette action est susceptible d'intervenir à des moments variés au cours des phases postmitotiques. Suivant le moment où elle se produira, les cellules rejetées dans le manteau seront différenciées en neuroblastes, glioblastes ou indifférenciées. Elle peut aussi intervenir prémitotiquement pour orienter globalement la production d'éléments cellulaires (hypothèses 2 et 3, tableau 8).

Il est également possible d'envisager l'action combinée de facteurs internes et de facteurs externes (hypothèse 4, tableau 8).

En définitive, il ressort de ces observations que l'orientation de la production cellulaire vers différents types cellulaires est sous la dépendance d'un programme. Le déroulement de ce dernier peut être contrôlé par :

- 1°/ Des facteurs internes (hypothèse 1, tableau 8). Cette hypothèse pourrait justifier le concept de chronologie relative (cf. discussion chapitre IV).
- 2°/ Des facteurs externes (hypothèses 2 et 3, tableau 8).
- 3°/ Des facteurs internes et des facteurs externes (hypothèse 4 tableau 8).

Dans tous les cas, il apparaît cependant que le concept de chronoar-chitecture ne peut être basé sur la notion de chronologie absolue (temps réel).

Hypothèses	Prolifération	Migration	Différenciation
1			
2 a/ b/			
3			
4			

Tableau 8 : I : facteurs internes ; E : facteurs externes ;
x : indice d'indétermination ; A,B,C : trois types
cellulaires.

DISCUSSION

A - Morphogenèse du Système Nerveux Central

Les résultats radioautographiques obtenus au cours de cette étude ont montré que la chronoarchitectonie s'organisait dans l'ensemble du système nerveux central selon des gradients complexes. Cette complexité étant probablement liée aux remaniements profonds que subit le tube neural au cours de l'ontogenèse en particulier sous la forme de plissements et de retournements, la compréhension des lois générales de l'organisation de ces gradients nécessitait donc comme base analytique leur reconstruction tridimensionnelle. Le fait le plus saillant qui se dégage est que, tout le long de l'axe nerveux, les couches anciennes sont d'une façon générale enfouies sous des apports plus récents. Cette constatation suggère immédiatement un rapprochement avec la 3^è loi morphogénétique énoncée par SPATZ (1966) : "Les structures les plus anciennes se déplacent vers l'intérieur dans l'ordre de leur genèse (principe d'introversion). Réciproquement, les parties récentes se dégagent librement vers la surface (principe de promination)".

Cette loi, établie à partir d'observations phylogénétiques effectuées par SPATZ sur des moulages intracrâniens, s'applique par définition aux structures nerveuses superficielles, mais nos observations chronoarchitectoniques montrent qu'elle n'est pas démentie au niveau des structures profondes. Nos résultats confirment également les conceptions de cet auteur sur l'interpénétration des vésicules encéphaliques. Cette dernière théorie est particulièrement illustrée par le postulat de l' "intussusception" du diencephale dans le télencéphale (SPATZ, 1921, 1924, 1925, 1927), qui a été démontré ultérieurement par les travaux de RICHTER (1966) sur le striatum. A côté de tels phénomènes de mélange intervésiculaire survenant au cours de l'ontogenèse, des neuromères entiers peu-

vent basculer et se présenter en succession verticale , alors que leur disposition fondamentale est longitudinale ; c'est ce que l'on observe, par exemple, dans le diencéphale. Aussi n'est-il pas certain que la neuromérie soit le strict reflet des étapes chronologiques de la progression du gradient caudo-rostral. De fait, elle pourrait au moins chez les Urodèles n'être que la conséquence de la métamérie mésodermique (DETWILER, 1964). Quoi qu'il en soit, la restructuration ontogénétique du système nerveux central, qui se manifeste par de vastes mouvements de plissement, de basculement et d'interpénétration, explique en grande partie la multiplicité des gradients chronoarchitectoniques observés.

1/ Gradient caudo-rostral

Ce gradient est net dans le tronc cérébral, surtout si l'on observe la progression du front de prolifération des couches les plus anciennes. Dans le diencéphale et surtout le télencéphale, il est moins net et parfois même contradictoire, suivant l'âge des couches observées. Ce fait résulte peut-être des remaniements que nous venons d'évoquer, mais il peut aussi dépendre de processus inductifs différents, puisque le chordencéphale est induit par la notochorde alors que l'acrencéphale l'est par la voûte de l'intestin primitif (DALCQ, 1946).

2/ Gradients transversaux

Si l'analyse radioautographique souligne la multiplicité de l'orientation des gradients transversaux, elle révèle aussi qu'une évolution continue les relie. On observe ainsi le passage à partir du bulbe, d'un type de stratification centrifuge relativement isotrope à une stratification centrifuge anisotrope dans le mésencéphale, fait qui peut s'exprimer en d'autres termes : les couches récentes s'empilent dorsalement et ventralement, de part et d'autre d'une lame composée essentiellement de cellules anciennes. Plus rostralement, cette lame ancienne se divise (diencéphale) et pousse ensuite des expansions dans le télencéphale. Il en résulte que le diencéphale aura une stratification

de base identique à celle du striatum, mais la soudure des deux masses thalamiques dans le plan sagittal donnera l'illusion d'une sédimentation centripète. Pour illustrer cette interprétation, on peut par exemple supposer qu'un tel gradient pseudocentripète s'observerait dans le cortex si, au cours d'une évolution phylogénétique à venir, les deux limbes du cortex cingulaire venaient à se souder par suite de la disparition de la scissure interhémisphérique.

Fait découlant de cette interprétation, les neuroblastes migreraient et se mettraient en place non pas par rapport à la zone ventriculaire émissive, mais en fonction, par exemple, de la position des cellules plus anciennes qui leur serviraient d'objectif. Ainsi pourrait s'expliquer pourquoi des zones ventriculaires situées en prolongement les unes des autres et structuralement très comparables peuvent être à l'origine de gradients diversement orientés par rapport à elles.

B - Cinétique de la migration cellulaire

Il semble que la migration des neuroblastes relève d'un phénomène unitaire, comme CAJAL (1911) l'avait partiellement décrit : le neuroblaste dont le noyau se trouve dans la zone ventriculaire adhère à la limitante interne par un court prolongement (stade apolaire de CAJAL), il différencie ensuite un prolongement externe, qui viendra s'amarrer à la limitante externe (MOREST, 1970). La migration intervient lorsque le neuroblaste possède deux prolongements (stade bipolaire de CAJAL) mais, rapidement, le prolongement interne se détache (MOREST, 1970) et se rétracte (stade unipolaire de HIS, 1889 ; et de CAJAL, 1911). Le neuroblaste se dirige alors vers la limitante externe puis se différencie comme en témoignent les poussées dendritiques et axoniques qui s'enchevêtrent avec les plexus axoniques afférents. Ainsi amarrés, les neurones conserveront une position fixe par rapport à ces plexus, tandis que les neuroblastes plus récents

s'aidant de leur prolongement externe passeront parmi eux pour se ranger près de la limitante externe. A leur tour, ils émettront des dendrites et s'ancreront dans les plexus afférents. En réponse à cette accumulation cellulaire, la limitante externe se déplacera vers l'extérieur. Cette cinétique que l'on retrouve en partie pour les glioblastes (présence des deux prolongements, rétraction du prolongement interne) avait été décrite par CAJAL (1911) qui, à ce propos, cite SALA (1894) : "... C'est la fixité de l'insertion du prolongement externe jointe à la contractilité du protoplasma de la portion périphérique, qui détermine le déplacement des corps cellulaires, leur graduelle émigration et leur arrêt dans les zones les plus diverses de la substance grise ...". CAJAL pensait que la véritable migration du neuroblaste était limitée par les arborisations dendritiques et qu'ainsi elle ne pouvait avoir lieu que durant les phases où les rameaux sont peu développés et lorsque les plexus des fibres afférentes que la cellule doit traverser ne forment pas un lacis impénétrable. MOREST (1970), pour sa part, estime à la suite d'observations effectuées par la méthode de Golgi rapide sur le cerveau antérieur d'Opossum que le neuroblaste ne se déplace pas en entier, mais que la migration se limite à un déplacement du péricaryon à l'intérieur du prolongement externe. Cependant, il n'exclut pas la possibilité d'une migration cellulaire complète de type amiboïde (CAJAL, 1911 ; LEVI-MONTALCINI, 1964). Mais il est vraisemblable que ce type de migration est plutôt le propre des glioblastes et des microneurones, comme cela vient d'être démontré pour les grains du cervelet (RAKIC, 1971) et suggéré pour certaines migrations du pulvinar (RAKIC et SIDMAN, 1969). Ces faits s'intègrent donc parfaitement dans le cadre de la chronoarchitectonie. Celle-ci implique en effet que la mise en place des neuroblastes ne s'effectue pas par rapport aux zones ventriculaires ; or, la rétraction précoce du prolongement interne est un argument en ce sens. D'autre part, la tendance générale à un tropisme de surface (limitante externe) est la mani-

festation évidente du gradient centrifuge que, pour notre part, nous concevons plutôt comme une tendance cellulaire à gagner les zones qui offrent le moins de résistance à la progression.

C - Mécanismes régulateurs de la migration et du positionnement cellulaire

La résolution des problèmes posés par la cinétique de la migration cellulaire répond à trois questions (DEHAAN 1958) : 1°/ Quels sont les paramètres qui commandent l'initiation de la migration ? 2°/ Quels sont ceux qui orientent le déplacement ? 3°/ Quels sont ceux qui bloquent la migration ?

Pour WEISS (1950, 1961), la première question ne se justifie pas, car, selon lui, les cellules possèdent *a priori*, la propriété de se mouvoir. Au cours du stade A (stade I de FUJITA, 1965), si les cellules ventriculaires restent groupées (bien que se déplaçant), ce serait donc par limitation des propriétés migratrices à l'intérieur de la zone ventriculaire. Quant aux facteurs qui orientent le déplacement des neuroblastes, ils doivent être identiques, que l'on considère le déplacement en bloc d'une cellule (migration amiboïde, CAJAL, 1911 ; LEVI-MONTALCINI, 1964 ; RAKIC, 1971) ou le déplacement en 2 étapes décrit en 1970 par MOREST (migration d'une expansion cytoplasmique qui servira de guide au déplacement interne du péricaryon).

Il nous paraît vraisemblable que les facteurs de pression agissent dans l'orientation du mouvement, soit en favorisant le déplacement des neuroblastes en direction des surfaces où règnent des pressions moindres, soit à l'inverse, en inhibant localement le tropisme centrifuge dans les régions de contrainte mécanique. Ceci correspondrait à un mécanisme de conduction sélective (WEISS, 1947) à partir d'un gradient physique (SCHAFFER, 1957). Il est possible que l'orientation du mouvement fasse appel à d'autres facteurs. RAKIC (1971) a signalé le rôle joué par les fibres gliales de BERGMANN, qui servent de guide dans

la migration des microneurones du cervelet. Beaucoup d'auteurs avaient auparavant envisagé le rôle d'un tel mécanisme de guidage par contact (ABERCROMBIE, 1961 ; WEISS, 1950, 1961), en soulignant le rôle des interfaces qui agissent comme des rails pour les pseudopodes (GAZE, 1967).

Ces mécanismes sont probablement très spécifiques, les cellules étant capables de se reconnaître par isoaffinité (WILSON, 1908 ; DEHAAN, 1958 ; WEISS, 1962). Les cellules en migration du système nerveux central possèdent d'ailleurs des structures particulières de détection. Ce sont les cônes de croissance (CAJAL, 1905, 1906), qui manifestent une motilité (LEWIS, 1912) et une structure très particulières (SOTELO et PALAY, 1968). Ils sont pourvus d'expansions cytoplasmiques, les filipodes, qui semblent en microcinématographie se comporter comme des palpeurs (NAKAI et KAWASAKI, 1959). MOREST (1970) pense que les axones afférents agissant comme des inducteurs, constituent des objectifs spécifiques pour ces prolongements. Ces derniers, lorsqu'ils arrivent au contact de l'axone afférent différencient des ramifications dont l'une d'entre elles sera l'axone efférent. Le péricaryon ne rejoindrait qu'ultérieurement cette région privilégiée. Ce mécanisme explique comment peut s'arrêter la migration, mais il est possible qu'une telle "inhibition de contact" (ABERCROMBIE, 1961) ou "coaptation" (WEISS, 1950) puisse s'exercer sur un support moins spécifique que les axones afférents, comme par exemple les cellules des générations précédentes.

D - Différenciation cellulaire

Les mécanismes qui contrôlent initialement la différenciation cellulaire sont certainement indissociables des précédents (MOREST, 1970). Cependant, dans le cadre de notre travail, seules les phases initiales de la différenciation seront discutées ici.

HIS (1889) pensait que, lors de leur émission hors de la zone ventricu-

laire, les cellules étaient déjà différenciées. VIGNAL (1889) et surtout SCHAPER (1897) estimaient au contraire que les cellules en migration étaient indifférenciées et que leur orientation en neuroblastes ou en spongioblastes (au sens de HIS, c'est-à-dire éléments précurseurs de névroglie) se faisait sur place. MELLER et al. (1966), effectivement, ne purent déceler, en microscopie électronique, de différence entre les neuroblastes en migration et les cellules ventriculaires et conclurent que la différenciation se faisait après que les cellules aient pris leur position définitive. Très récemment, BUTLER et CALEY (1972) en combinant microscopie électronique et radioautographie ont abouti à une conclusion opposée, en affirmant que la différenciation du neuroblaste est un phénomène qui commence dès la migration, ce qui rejoint les observations de MOREST (1970) qui a observé des poussées dendritiques dans les mêmes circonstances. Dans les couches superficielles du néocortex postnatal de Rat, CALEY et MAXWELL (1968 a et b) n'ont trouvé aucune différence entre les cellules indifférenciées, qui donneront ultérieurement les neurones et les cellules gliales. On doit remarquer que ces auteurs proposent successivement deux arguments contradictoires : le premier en faveur de la théorie de SCHAPER (pluripotentialité de cellules "indifférentes") et le second en faveur de la théorie de HIS (unipotentialité cellulaire). Il est néanmoins certain qu'à l'heure actuelle ces deux théories sont compatibles.

S'il est prouvé que les cellules ventriculaires des macroneurones, des microneurones, des cellules gliales et des cellules épendymaires dérivent d'une même source -ce qui va dans le sens des conceptions de SCHAPER-, il est certain que la zone ventriculaire subit une évolution au cours du temps et qu'elle produira préférentiellement et successivement chacun de ces types cellulaires, fait qui vient à l'appui de la théorie de HIS. C'est également le cas des observations citées plus haut démontrant l'orientation morphologique précoce des neuroblastes, ou de celles qui découlent des cultures de tissu embryonnaire *in vitro* et

démontrent l'irréversibilité de la différenciation (CRAIN, 1970). Dans les phases terminales de la prolifération dans le système nerveux central, il est également certain qu'on assiste à une perte de spécificité. C'est à ces stades que les zones subventriculaires puis subépendymaires produisent des cellules moins différenciées (microneurones et cellules gliales) et parfois simultanément, fait qui a été démontré dans le cervelet (ALTMAN et DAS, 1966). L'observation de CALEY et MAXWELL (1968 a et b) peut probablement s'intégrer dans ce contexte de zones émissives en fin d'évolution.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

Si la radioautographie se révèle un moyen d'approche fructueux de l'ontogenèse et de l'histogenèse du système nerveux central, l'expérimentation en ce domaine se heurte, néanmoins à d'importantes difficultés analytiques qui tiennent au nombre très élevé des cellules marquées et à l'extrême diversité des patterns de marquage qui les caractérise. Notre travail, initialement centré sur l'ontogenèse du thalamus chez le Rat, a comporté une étude technique relativement importante, qui visait à résoudre ces problèmes. Ultérieurement, l'extrême rapidité opérationnelle inhérente aux procédés mis au point devait permettre d'élargir notre champ d'investigation à l'ensemble de l'encéphale et de dégager les lois spatio-temporelles, groupées dans le concept de chronoarchitectonie, qui président à l'histogenèse et à la morphogenèse du système nerveux central du Rat. Dans les premiers stades de son développement, le tube nerveux est homogène, structuralement et fonctionnellement. Cependant, au cours de l'embryogenèse, la loi d'hétérochronie s'exprime par un gradient caudo-rostral au niveau structural. Ce décalage est probablement la résultante de caractéristiques cinétiques hétérogènes différenciant entre eux les niveaux transversaux. Des variations très faibles des paramètres du cycle génératif (TC) suffiraient à l'expliquer, mais la classique méthode des mitoses marquées est insuffisamment précise pour en donner la preuve. Elle nous a néanmoins permis de démontrer l'allongement du cycle génératif moyen -obtenu par intégration à plusieurs niveaux-, ainsi que la relative stabilité de sa phase de synthèse (TS) au cours de l'ontogenèse.

A un niveau déterminé et au cours des premiers stades, le compartiment prolifératif se révèle homogène. A condition de respecter les impératifs de la radioautographie quantitative, le pattern de répartition des cellules marquées de la génération contemporaine de l'injection est proche de la loi de Poisson. Ultérieurement, la perte des capacités mitotiques dans un nombre de plus en plus élevé de cellules ventriculaires diminue l'homogénéité du compartiment, mais sans que cela ait une incidence sur l'histogramme "poissonnien" initial. Ce fait s'étend à tous les niveaux selon une chronologie caudo-rostrale et constitue une étape dans l'évolution morphologique et fonctionnelle des zones ventriculaires.

Dans les ensembles neuroniques adultes, l'histogramme "poissonnien" initial (histogramme partiel) se déforme par l'accumulation de générations successives. Cette distorsion, qui peut être quantifiée par l'intermédiaire de paramètres tels que le pourcentage de cellules marquées, la moyenne des grains et le nombre de grains maximum, répond à des lois d'évolution précises. Ces dernières font intervenir essentiellement le comportement des molécules marquées (temps de disponibilité), le rapport TS/TC et le moment de l'injection par rapport à la séquence d'équipement de la région considérée (début et fin de formation). L'histoire d'une région est ainsi entièrement contenue dans son histogramme global, complété par les paramètres précités. Elle pourra être reconstituée à partir des lois théoriques précédentes. Cette méthode d'analyse, après avoir été validée par recoupement avec des résultats cartographiques (thymidine ^3H) et photométriques (thymidine ^{14}C), est à la base de la notion de *chronoarchitectonie* qui, en complément des paramètres chronologiques, fait appel aux caractéristiques d'agencement réciproque des générations successives de neurones marqués (notion d'*isochrone* et de *chevauchement*). A propos de génération, il faut souligner que cette notion découle de l'emploi d'un marqueur. Celui-ci en s'incorporant à un certain nombre de cellules en phase de synthèse, crée

l'illusion d'une "vague" cellulaire. Mais, en réalité, la production des neurones est un phénomène continu. Ainsi, dans le cortex, il n'existe aucune correspondance particulière entre les différentes générations marquées et les couches corticales. Qui plus est, les isochrones cellulaires ne sont même pas concentriques avec ces couches. Ce dernier fait démontre que des types cellulaires définis, comme par exemple les cellules étoilées de la couche IV, ne sont pas nécessairement produits isochroniquement (chronologie absolue). Mais, compte tenu du gradient caudo-rostral, il est cependant possible que les divers types cellulaires répondent à une loi de chronologie relative. En général, la ségrégation en couches ou en noyau ou en pronucleus, apparaît comme un phénomène indépendant de la production neuronique.

Considérée en elle-même, celle-ci s'organise en gradients plus ou moins nets suivant l'importance du chevauchement des générations (taux de mélange). Dans les phases de production élevée, le chevauchement est important ; à l'inverse, en fin de production, la stratification devient plus évidente. Suivant les niveaux, ces gradients peuvent présenter des orientations très variables. Ainsi, le gradient caudo-rostral n'est à peu près net que dans le tronc cérébral. Il l'est encore moins dans le prosencéphale au point de disparaître dans le télencéphale. Dans le plan transversal, les gradients moyens sont de type centrifuge et s'organisent autour d'un axe ancien de forme assez complexe. Le gradient centrifuge s'exprime préférentiellement en direction dorsale et pourrait correspondre à un tropisme manifesté par les cellules ventriculaires en direction des zones de moindre résistance. L'existence de cellules anciennes ou très anciennes à tous les niveaux du névraxe (y compris le télencéphale) montre que la conception d'un système nerveux s'édifiant exclusivement dans le sens caudo-rostral par apposition transversale de structures se succédant ontogénétiquement est très discutable. Il semblerait plutôt que les générations cellu-

laïres successives s'organisent comme des emboîtements de cônes révélant par là l'existence d'une composante longitudinale. Cependant, nos résultats s'accordent dans l'ensemble avec les données de la phylogénèse. Lorsque ce n'est pas le cas, les neurones discordants appartiennent généralement à une catégorie particulière, les microneurones. Ces éléments seraient produits plus tardivement que les macroneurones et auraient des caractéristiques morphologiques et cinétiques intermédiaires entre ces derniers et les cellules gliales. Ils sont plus nombreux dans les vésicules caudales et absents dans l'isocortex. Aussi, peut-on se demander si leur rôle ne serait pas d'enrichir et d'ajuster fonctionnellement les structures plus anciennes, en réponse aux acquisitions phylogénétiques, dont la dernière étape est la corticalisation.

R E S U M E

Le travail que nous avons réalisé a été consacré à l'histogenèse du système nerveux central chez le Rat, sur la base d'une méthodologie originale de radioautographie quantitative après marquage cellulaire par la thymidine tritiée ou la thymidine ^{14}C .

Le précurseur est administré par injection aux rattes gestantes à différents stades. Pour déterminer des paramètres cinétiques prénataux comme la prolifération ou les cycles génératifs, le sacrifice est pratiqué peu après l'injection. Lorsqu'il s'agit de localiser le site définitif des neurones marqués, le sacrifice est différé ; il a lieu soit peu après la naissance, soit le plus souvent à l'âge adulte.

Les radioautographies sont obtenues par différentes méthodes : sur plaques, par stripping ou par dipping. Dans ce dernier cas, une technique originale a été élaborée (centrifugation des lames) afin de permettre, à l'étape des radioautogrammes, une analyse quantitative sur coupes sériées.

La quantification fait intervenir un procédé nouveau, combinant photométrie, cartographie et traitement numérique. Appliqué tout particulièrement à l'analyse cellule par cellule des radioautographies tritiées, il a été étendu ultérieurement au scanning photométrique des radioautogrammes ^{14}C . L'extrême complexité des patterns de marquage observables au niveau cellulaire dans le cerveau adulte nous a conduit à élaborer un modèle de fonctionnement cinétique des zones cellulaires embryonnaires. L'étude des principaux facteurs impliqués dans la conception de ce modèle a été conduite systématiquement : facteurs métaboliques au niveau des molécules marquées (dégradation et temps de disponibilité),

facteurs structuraux (homogénéité et évolution des zones ventriculaires), facteurs cinétiques initiaux (cycles génératifs), facteurs physiques et techniques (fluctuations de Poisson de la désintégration radioactive ; fiabilité de la réponse radioautographique).

Les règles précises dérivant de ce modèle ont été appliquées au système nerveux afin de reconstituer l'histoire des neurones de chaque région (début et fin de formation, nombre de générations), mais aussi d'en préciser les relations spatiales (importance du chevauchement des différentes générations). L'ensemble de ces données spatio-temporelles permet de proposer une nouvelle systématisation de l'histogenèse du système nerveux central sous le vocable de *chronoarchitectonie*.

Considéré au niveau des populations cellulaires (macroneurones, microneurones, cellules gliales), ce concept révèle la continuité fonctionnelle des zones ventriculaires et le rôle particulier joué par les microneurones.

Regroupés au sein d'une reconstruction tridimensionnelle, les résultats ont été examinés sous l'angle de la phylogenèse et différentes hypothèses ont été proposées, notamment en ce qui concerne les mécanismes de la migration et de la différenciation cellulaires.

